

Aus dem Lehrstuhl Innere Medizin I  
Leitung: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

*Charakterisierung der Veränderung des  $\beta_2$ -  
Adrenorezeptor Signalwegs in B-Zellen im Verlauf der  
murinen, Kollagen Typ II induzierten Arthritis*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Clemens Julian Wiest

2017



Aus dem Lehrstuhl Innere Medizin I  
Leitung: Prof. Dr. Martina Müller-Schilling  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

*Charakterisierung der Veränderung des  $\beta_2$ -  
Adrenorezeptor Signalwegs in B-Zellen im Verlauf der  
murinen, Kollagen Typ II induzierten Arthritis*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Clemens Julian Wiest

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Pongratz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Grässel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2018

## Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis.....	VII
II. Tabellenverzeichnis.....	VIII
III. Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1. Einleitung .....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis (RA) .....	1
1.2 Das sympathische Nervensystem .....	15
1.2.1 Grundlagen.....	15
1.2.2 Alpha- und Betarezeptoren .....	19
1.2.2 Signalweg des $\beta$ -Adrenorezeptors .....	22
1.2.3 Arrestine.....	27
1.2.4 Das sympathische Nervensystem und rheumatoide Arthritis .....	30
1.3 Die B-Zelle .....	36
1.3.1 Grundlagen.....	36
1.3.2 Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die B- Zelle.....	41
1.3.3 Die B-Zelle in der RA.....	43
1.4 Interleukin 10 .....	52
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	56
2. Material und Methoden .....	58
2.1 Versuchsaufbau .....	58

2.1.1 Haltung der Mäuse.....	61
2.1.2 Induktion der experimentellen Arthritis und Erstellung des klinischen Scores.....	61
2.1.3 Isolierung der Milz-B-Zellen .....	63
2.2 Aufbau des Stimulationsversuchs .....	65
2.3 Durchflusszytometrie .....	66
2.4 FACS-Färbungen .....	69
2.4.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen.....	69
2.4.2 Färbungen .....	71
2.5 Auswertung.....	97
3. Ergebnisse .....	98
3.1 Adrenerge Rezeptoren auf Milz-B-Zellen im Verlauf der CIA .....	99
3.2 Regulation des $\beta$ 2-Adrenorezeptors .....	109
3.3 Intrazelluläre Signalwege .....	112
3.4 Intrazelluläres Interleukin 10 .....	120
3.5 <i>second-messenger</i> nach Stimulation.....	125
3.6 Partielle Korrelationen.....	130
4. Diskussion .....	131
4.1 Expression der Adrenorezeptoren im Verlauf der Arthritis..	134
4.2 Veränderungen in der Rezeptorregulation.....	142
4.3 Intrazelluläre Second-Messenger .....	145
4.4 Intrazelluläres Interleukin 10 .....	148

4.5 Second-Messenger nach Stimulation .....	151
5. Ausblick .....	157
6. Zusammenfassung.....	159
7. Literatur.....	A

## I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der angewendeten Methode. ....	59
Abbildung 2 Schematische Darstellung des Stimulationsversuchs.....	60
Abbildung 3 Ergebnis der Etablierungsversuche für den $\beta$ 2-AR .....	73
Abbildung 4 Ergebnis der Etablierungsversuche für den $\alpha$ 1-AR .....	75
Abbildung 5 Ergebnis der Etablierungsversuche für $\beta$ -Arrestin 2.....	78
Abbildung 6 Ergebnis der Etablierungsversuche für die GRK2.....	80
Abbildung 7 Ergebnis der Etablierungsversuche für die p38 MAP Kinase .....	83
Abbildung 8 Ergebnis der Etablierungsversuche für die phospho p38 MAP Kinase.....	85
Abbildung 9 Ergebnis der Etablierungsversuche für ERK 1/2.....	88
Abbildung 10 Ergebnis der Etablierungsversuche für phosphoERK 1/2 .....	90
Abbildung 11 Ergebnis der Etablierungsversuche für CREB .....	92
Abbildung 12 Ergebnis der Etablierungsversuche für phosphoCREB.....	95
Abbildung 13 Ergebnis der Etablierungsversuche für IL-10.....	96
Abbildung 14 $\beta$ 2-Adrenorezeptor positive B-Zellen.....	101
Abbildung 15 $\beta$ 2-Adrenorezeptor MFI auf B-Zellen .....	102
Abbildung 16 $\alpha$ 1-Adrenorezeptor positive B-Zellen.....	103
Abbildung 17 $\alpha$ 1-Adrenorezeptor MFI .....	104
Abbildung 18 Korrelation BetaAR MFI AlphaAR positive B-Zellen .....	105
Abbildung 19 Korrelation BetaAR MFI AlphaAR MFI.....	106
Abbildung 20 Korrelation BetaAR positive B-Zellen AlphaAR positive B-Zellen .....	107
Abbildung 21 Korrelation BetaAR positive B-Zellen AlphaAR MFI .....	108

Abbildung 22 GRK2 MFI .....	110
Abbildung 23 $\beta$ -Arrestin 2 MFI.....	111
Abbildung 24 CREB MFI .....	113
Abbildung 25 pCREB MFI .....	114
Abbildung 26 ERK 1/2 MFI.....	116
Abbildung 27 pERK MFI.....	117
Abbildung 28 p38 MFI .....	118
Abbildung 29 pp38 MFI.....	119
Abbildung 30 IL-10 MFI.....	121
Abbildung 31 IL10 positive B-Zellen .....	122
Abbildung 32 Korrelation $\beta_2$ -AR MFI IL-10 MFI .....	123
Abbildung 33 Korrelation $\beta_2$ -AR positive B-Zellen IL-10 positive B-Zellen .....	124
Abbildung 34 pp38 MFI nach Stimulation .....	126
Abbildung 35 pCREB MFI nach Stimulation.....	127
Abbildung 36 pERK MFI nach Stimulation .....	129

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Erstellung des klinischen Scores.....	62
Tabelle 2 Einstellungen des FACS- Geräts.....	68
Tabelle 3 Kompensationseinstellungen.....	69
Tabelle 4 Partielle Korrelationen unter Kontrolle für den Entzündungsgrad .....	131
Tabelle 5 Partielle Korrelationen unter Kontrolle für die Entzündungsdauer .....	131
Tabelle 6 Schematischer Überblick über die Ergebnisse.....	133





### III. Abkürzungsverzeichnis

<i>ACR</i>	<i>American college of Rheumatology</i>
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
<i>APC</i>	<i>antigen presenting cells</i>
AR	Adrenorezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
<i>BCR</i>	<i>B-cell receptor</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
<i>cAMP</i>	<i>cyclic Adenosinmonophosphat</i>
<i>CCP</i>	<i>cyclic citrullinated proteins</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<i>CIA</i>	<i>Collagen induced Arthritis</i>
CII	Kollagen Typ II
<i>CREB</i>	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerol
<i>DMARD</i>	<i>Disease modifying antirheumatic drugs</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>ERK</i>	<i>Extracellular signal regulated Kinase</i>
<i>FACS</i>	<i>Flourescence-activated Cell Sorting</i>

FLK	Freie Leichtketten
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein Rezeptor Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HHA	Hypothalamo-Hypophysäre Achse
<i>HLA</i>	<i>Human leucocyte antigen</i>
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAP Kinase	Mitogen aktivierte Protein Kinase
<i>MHC</i>	<i>Major Histokompatibilitäts Komplex</i>
MTX	Methotrexat
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NS	Nervensystem
OA	Osteoarthritis
<i>OPSI</i>	<i>Overwhelming post splenectomy infection</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>

PDE	Phosphodiesterase
<i>MACS</i>	<i>Magnetic Cell Separation</i>
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositoltriphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNS	Peripheres Nervensystem
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktoren
<i>SNP</i>	<i>single nukleotid polymorphism</i>
SNS	Sympathisches Nervensystem
<i>SOCS</i>	<i>Suppressor of Cytokine signaling</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<i>TCR</i>	<i>T-cell receptor</i>
<i>TGF</i>	<i>Tumor Growth Factor</i>
TH+ Zelle	Tyrosinhydroxylase positive Zelle
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
<i>TLR</i>	<i>Toll like Receptor</i>
TNF	Tumornekrose Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Derzeit ist in den westlichen Industrieländern ca. 1 % der Gesamtbevölkerung an RA erkrankt [1]. Insgesamt sind mehr Frauen als Männer betroffen w:m=2-3:1 [2]. In der Bevölkerungsgruppe über 55 Jahren liegt die Prävalenz bei ca. 2 % [2]. Zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr kommt es zu einem Erkrankungsgipfel [2]. Die jährliche Neuerkrankungsrate beträgt 0,02-0,05 % [5]. Die Lebenserwartung von Patienten, die an RA erkrankt sind, ist um sieben Jahre reduziert [1].

Initial führt die RA bei den Patienten zu unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, nächtlichem Schwitzen und subfebrilen Temperaturen [1,2]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Arthritis, Synovitis, Bursitis und Tendovaginitis. Klinisch imponieren die Patienten durch Schmerzen, Gelenkschwellung und Gelenksteifigkeit.

Typischerweise tritt die Arthritis an den Hand- und Fußgelenken, den Finger- und Zehengrundgelenken und den proximalen Interphalangealgelenken auf. Dabei ist der Befall meist symmetrisch. Die RA kann jedoch auch größere Gelenke, das Kiefergelenk und die Halswirbelsäule befallen.

Die RA beschränkt sich nicht nur auf Gelenke und gelenksnahe Strukturen, ebenso sind verschiedene extraartikuläre Organmanifestationen möglich.

Unbehandelt führt die RA zu einer irreversiblen Gelenksdestruktion und damit verbunden zu einem Funktionsausfall der betroffenen Gelenke.

Bisher konnte die exakte Pathogenese der RA nicht abschließend geklärt werden, Einigkeit besteht jedoch über eine multifaktorielle Genese.

In Zwillingsstudien konnte bei monozygoten Zwillingen eine Konkordanz zwischen 15 und 30% gezeigt werden, während die Konkordanz bei dizygoten Zwillingen nur ca. 5% betrug [11], was auf eine genetische Komponente hinweist.

Circa 70% der an RA Erkrankten tragen das HLA-Allel DR4/DRB1 [2] (Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung 25%), das relative Erkrankungsrisiko ist durch das Vorhandensein eines HLA-DR4 Allels vierfach erhöht [6]. Die betroffenen Allele scheinen alle eine gemeinsame Aminosäuresequenz in einem Bereich der hypervariablen Region des HLA-Moleküls zu haben [144]. Diese wird *shared epitope* genannt. Diese Region scheint funktionelle Eigenschaften zu haben, die für die Präsentation von (Auto)- Antigenen und Erkennung durch T-Zellen wichtig ist. Der exakte Mechanismus, der für die Assoziation zwischen RA und dem *shared epitope* verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt [144,145,146].

Es wird beschrieben, dass die Struktur eines präsentierten Antigens auf dem HLA-DR4 so verändert ist, dass die Struktur des präsentierten Antigens nicht exakt aufrechterhalten wird. Als Resultat dieser Interaktion zwischen Antigen und HLA-Molekül scheint die Erkennung des Antigens durch T-Zellen weniger Antigen-spezifisch zu sein, sondern generell Antigen-abhängig [144,146,146].

Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen RA und *SNP's (single nukleotid polymorphisms)* in einer Reihe von Genen, die Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung und den *NF-κB pathway* haben, gezeigt werden [11].

Neben genetischen Einflüssen konnten auch Umwelteinflüsse nachgewiesen werden.

Zu den nachgewiesenen Umweltfaktoren gehören Zigarettenkonsum [4,5,7,8,10], Schädigung der Lunge durch silikogene Stäube [10], höheres Alter und Übergewicht [2].

Rauchen hat aber nicht nur Einfluss auf das Erkrankungsrisiko, sondern auch auf die Krankheitsaktivität [4].

Ein weiterer Umweltfaktor sind sogenannte kritische Lebensereignisse [10]; dabei wird eine Veränderung in der Hypothalamo-Hypophysären-Adrenalen-Achse als molekulares Korrelat diskutiert [10,12,21,22]. Normalerweise reagiert der Organismus auf Stress mit erhöhten Spiegeln von Stresshormonen wie Glukokortikoiden und Katecholaminen, die neben



vielfältigen anderen Wirkungen auch immunsupprimierende Effekte haben. Bei Patienten mit RA sind die Serumspiegel von Glukokortikoiden in Relation zu den zirkulierenden Interleukinen jedoch inadäquat niedrig [21,22]. Dies legt den Schluss nahe, dass eine Veränderung in dieser Achse besteht, die die Aufrechterhaltung der Krankheit fördert. Eine mögliche Erklärung für die Förderung eines Krankheitsausbruchs könnte eine verminderte glukokortikoide Reaktion auf Stress sein, die durch einen geringeren Selektionsdruck auf Immunzellen zu einem längeren Überleben autoreaktiver Zellen führt.

Vor dem Hintergrund einer genetischen Disposition und anderen modulierenden Einflüssen werden Infektionen, zum Beispiel durch CMV, EBV, E. Coli, Proteus spp. oder Porphyromonas gingivalis als Trigger für die pathologische Immunreaktion diskutiert [2,5,10,13]. Die Mechanismen, die hierfür verantwortlich sind, sind nicht vollständig verstanden; ein molekulares Mimikry und die Förderung von Proteinzitrullinierung mit nachfolgender

Antikörperbildung gegen diese zitrullinierten Proteine werden diskutiert.

Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass bestimmte gastrointestinale und urogenitale Infektionen das Erkrankungsrisiko senken können [3].

Als Erklärungsansatz dient hier eine Beeinflussung des individuellen Mikrobioms, dem damit, je nach Ausprägung, eine protektive, aber auch risikoerhöhende Wirkung in Bezug auf die RA zugeschrieben werden kann [3,14].

Im Serum von RA Patienten lassen sich so genannte Rheumafaktoren (RF) und Antikörper gegen zyklisch zitrullinierte Peptide (Anti-CCP-AK) nachweisen. Bei den Rheumafaktoren handelt es sich meist um IgM, die gegen den Fc- Teil von IgG gerichtet sind [6,18].

Der positiv prädiktive Wert der RF für einen Ausbruch der Erkrankung ist allerdings umstritten, da 20% der Fälle [2] seronegativ verlaufen und sich bei 5-10% der Gesunden und bei anderen chronisch verlaufenden Krankheiten RF im Serum nachweisen lassen.

Jedoch besitzen die RF bei manifester Krankheit einen prädiktiven Wert für das Auftreten von Gelenkserosionen, persistierender Synovitis und für die Notwendigkeit einer intensiven Behandlung [9].

Die Anti-CCP-AK besitzen eine hohe Spezifität für die RA (>95% [2]). Bei über 50% der Patienten lassen sich im Frühstadium oder bereits vor dem klinischen Ausbruch der Erkrankung Anti-CCP-AK nachweisen. Das Vorhandensein von Anti-CCP-AK ist ein prädiktiver Marker für nachfolgende strukturelle Schäden in den betroffenen Gelenken, in enger Assoziation mit einer anhaltenden Synovitis [9]. Diese Antikörper haben also neben einem prognostischen Wert möglicherweise auch eine gewisse pathogenetische Rolle, da ihr Auftreten mit einem häufigeren Eintritt von Gelenkschäden assoziiert ist [9,10,18]. Es konnte gezeigt werden, dass Anti-CCP-AK die Bildung von Osteoklasten zusammen mit TNF $\alpha$  und IL-8 induzieren können und zum Verlust von Knochenmasse beitragen [160].

Weitere Proteine, die im Serum von RA Patienten mit hoher Spezifität nachgewiesen werden können, sind 14-

3-3 $\eta$  [15,16] Protein und freie Leichtketten (FLK) [143]. Diese Marker sind in Lage Patienten mit RA von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen oder Osteoarthritis bzw. Gesunde zu unterscheiden [16]. 14-3-3 $\eta$  Protein erkennt auch Patienten, die Anti-CCP Antikörper negativ sind [9].

In Zukunft dürften diese beiden Marker noch an klinischer Bedeutung gewinnen, da für 14-3-3 $\eta$  gezeigt werden konnte, dass die Serumspiegel mit dem Ansprechen auf TNF $\alpha$ -Antagonisten korrelieren und die FLK bereits 5-7 Jahre [143] vor der klinischen Manifestation nachweisbar sind und mit einer erhöhten Mortalität einhergehen [143]. Beide Marker unterstreichen die Bedeutung der B-Zellen in der RA, da die FLK ein Produkt der B-Zell sind und 14-3-3 $\eta$  an der Regulation des Immunglobulin *class-switch* beteiligt ist [15].

Vor einer genetischen Suszeptabilität und modulierenden Umwelteinflüssen kommt es zu einer entzündlichen Infiltration der Membrana synovialis mit T-

Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen und dendritischen Zellen [2]. Dies ist der Vorgang, der entscheidend zum Beginn der Entzündungsreaktion führt [10].

Im Zentrum der immunologischen Reaktion steht die Interaktion von Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen, die zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (zum Beispiel IL-1, IL-15, TNF $\alpha$ ) und Chemokinen führt [2,6,10]. Dadurch kommt es zu einer ausgeprägten Neoangiogenese, der eine Vaskularisierung der Synovialmembran folgt [10], was eine stärkere Infiltration mit Entzündungszellen ermöglicht.

Die Veränderungen des Mikroenvironments führen zusammen mit aktivierten Fibroblasten der Synovia zum Aufbau des Pannusgewebes [2,10]. Diese pathologisch verdickte Synovialmembran wuchert zunehmend über den Gelenkknorpel und den benachbarten Knochen. Dies führt zu einem lokalen Zytokinmilieu, durch das besonders Typ A Synoviozyten, lokale Makrophagen-ähnliche Zellen, eingewanderte Makrophagen und

Monozyten aktiviert werden. Die Aktivierung der Makrophagen führt zu einer Freisetzung von Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 und 23), reaktiven Sauerstoffspezies und knorpelabbauenden Enzymen (Matrix-Metalloproteinasen, Endopeptidasen) [1,2,10].

Mit fortschreitender Krankheit dringt diese Schicht immer weiter in den Knorpel vor und schädigt das Gewebe. Nachfolgend kommt es sukzessiv zu einem Abbau des Knochens [1,2,6].

Als mögliche Ursache für die inflammatorischen Prozesse und deren Aufrechterhaltung wird das Vorhandensein von Autoantikörpern diskutiert. Als mögliche Autoantigene kommen Kollagen Typ II, Proteoglykane, Aggrecan, Knorpelverbindungsproteine und Hitzeschockproteine infrage [6]. Eine mögliche Quelle für diese Antigene ist der abgebaute Gelenkknorpel. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die Aufrechterhaltung der entzündlichen Vorgänge, da das Immunsystem so immer wieder mit primär nicht zugänglichen und nicht beseitigbaren Autoantigenen in

Kontakt kommt. Eine besondere Rolle kommt dabei den B-Zellen zu. Diese sind nicht nur für die Produktion von (Auto)-Antikörpern verantwortlich, sondern sind auch effektive antigenpräsentierende Zellen und produzieren Zytokine [18].

Eine einzige Zellpopulation, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung der RA verantwortlich ist, gibt es aber nicht. Dies zeigt sich am Beispiel Rituximab, einem CD20-Antikörper, der zu einer B-Zell Depletion führt und bei einem Teil der Patienten zu einer Verbesserung der Symptome führt. Bei einem anderen Teil des Patientenkollektivs schlägt diese Therapie jedoch nicht an.

Die RA führt unbehandelt zu einer Gelenkdestruktion und einem irreversiblen Funktionsverlust der Gelenke.

Um die Folgen der RA nach Möglichkeit zu verhindern und für den Patienten eine bestmögliche Lebensqualität zu erreichen, ist eine konsequente und ausreichende Therapie erforderlich. Dafür ist eine frühzeitige und zuverlässige Diagnosestellung notwendig.

Die Klassifikation einer Arthritis als RA wird zur Zeit nach den ACR-Kriterien von 2010 gestellt [2]. Dabei werden die Anzahl und Art der betroffenen Gelenke, die Dauer der Symptome, die Antikörper-Serologie und systemische Entzündungszeichen (CRP und BSG) zur Diagnosestellung herangezogen.

Die Therapie der RA beruht auf mehreren Säulen. Im Vordergrund steht die Therapie des entzündlichen Prozesses. Schmerzen werden symptomatisch therapiert, Physiotherapie wird eingesetzt, um den Patienten vor Schäden durch schmerzbedingte Immobilisierung zu schützen.

Eine wichtige Substanzklasse sind Glukokortikoide. Diese werden sowohl hochdosiert in der „Schubtherapie“ der RA eingesetzt, als auch niedrig dosiert in der Dauertherapie.

Die Wirkung der medikamentös eingesetzten Glukokortikoide beruht auf einer Hemmung des NF $\kappa$ B-Signalwegs in Zellen des Immunsystems [19]. Dies führt letztlich zu einer verminderten Produktion von TNF $\alpha$  und



Zytokinen, sowie der Induktion von Apoptose in Lymphozyten.

Die krankheitsmodifizierende und steroideinsparende Basistherapie erfolgt mit sogenannten DMARD (*Disease modifying antirheumatic drugs*). Die dafür verwendeten Substanzen greifen in Mechanismen ein, die für die Aufrechterhaltung der RA wichtig sind.

Zu den am häufigsten eingesetzten Substanzen gehört Methotrexat (MTX). Dieses wirkt als Folsäureantagonist [20, 161] zytostatisch auf sich teilende Zellen. Außerdem erhöht MTX immunsupprimierendes Adenosin [161], hemmt die Bildung toxischer Substanzen [161] und vermindert intrazelluläres Glutathion [161], was die Funktion und Rekrutierung von Makrophagen hemmt [161].

Eine weitere Substanzklasse, die bei der Therapie der RA zum Einsatz kommt, sind Antagonisten des TNF $\alpha$ -Systems. Dabei werden monoklonale Antikörper gegen TNF $\alpha$  eingesetzt.

In Bezug auf die RA spielt TNF $\alpha$  eine fundamental wichtige Rolle [10]. Insgesamt führt TNF $\alpha$  zu einer

vermehrten Akkumulation von Zellen des Immunsystems in den betroffenen Geweben [10,23,24].

Schließlich kann eine therapeutische B-Zell-Depletion durchgeführt werden. Dazu wird Rituximab eingesetzt [2,10], ein Antikörper gegen CD20, ein Oberflächenmarker auf B-Zellen. Der klinische Erfolg dieser Behandlungsoption spricht für eine wichtige Rolle der B-Zellen in der RA.

Oft ist jedoch durch eine medikamentöse Monotherapie keine zufriedenstellende Wirkung zu erzielen. In diesen Fällen ist dann eine Kombination von DMARDs mit Biologicals möglich.

Die komplexe Pathogenese der RA, die Kompromittierung systemischer Hormonachsen im Verlauf der Erkrankung, die vielschichtige Regulation des Immunsystems, der hohe Leidensdruck der Patienten, eine fehlende kausale Therapie und die zum Teil schweren Nebenwirkungen der bisherigen Therapien machen es unumgänglich, weitere Energie in die Erforschung und Entwicklung weiterer

Therapiemöglichkeiten zu investieren. Ein mögliches Ziel künftiger Behandlungsmethoden könnte das autonome Nervensystem sein, das in der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle spielt.

## 1.2 Das sympathische Nervensystem

### 1.2.1 Grundlagen

Das Nervensystem (NS) des Menschen kann verschieden eingeteilt werden. Anatomisch ist eine Unterteilung in einen zentralen und einen peripheren Anteil möglich. Das periphere NS fungiert dabei als Rezeptor- und Ausführorgan des ZNS [25]. Funktionell können sowohl das ZNS als auch das PNS in autonome und somatische Anteile unterteilt werden.

Der efferente Teil des somatischen NS dient der willkürlichen Steuerung der Muskulatur. Die Afferenzen vermitteln dem ZNS die bewussten Wahrnehmungen der Peripherie.

Das autonome NS setzt sich aus drei Teilen zusammen; dem Parasympathikus, dem Sympathikus und dem enterischen NS. Parasympathikus und Sympathikus sind

im ganzen Körper vorhanden, während sich das enterische NS in den Wänden des Verdauungstrakts befindet. Das autonome NS dient der unbewussten und unwillkürlichen Steuerung der inneren Organe und damit lebenswichtiger Vorgänge, wie Atmung, Verdauung und Blutdruckregulation [25].

In den meisten Fällen sind Sympathikus und Parasympathikus funktionelle Antagonisten. Generell vermittelt der Parasympathikus eine trophotrope Wirkung („*rest and digest*“) auf den Körper; der Sympathikus vermittelt eine ergotrope („*flight or fight*“) Wirkung [34]. Beide Systeme besitzen eigene Kerngebiete und hierarchisch strukturierte Schaltzentren. Gemeinsam ist den beiden Systemen der im Diencephalon gelegene Hypothalamus als höchstes Steuerzentrum. Weitere, untergeordnete Zentren liegen im Hirnstamm [29,35] und im thorakalen bzw. sakralen Rückenmark. Diesen Zentren entspringen die ersten efferenten Neurone der entsprechenden Systeme. Die ersten Neurone beider Systeme verwenden Acetylcholin als Transmitter. Sie projizieren beim Sympathikus in prävertebrale

sympathische Ganglien bzw. beim Parasympathikus in organnahe parasympathische Ganglien. Eine Ausnahme stellt dabei das Nebennierenmark dar, das als sympathisches Ganglion fungiert, seine Transmitter aber nicht in einen synaptischen Spalt, sondern in den gesamten Blutkreislauf ausschüttet.

Die zweiten Neurone der beiden Systeme unterscheiden sich in ihren Transmittern. Die zweiten Neurone des Parasympathikus nutzen Acetylcholin als Transmitter, die Botenstoffe des Sympathikus sind Noradrenalin und Adrenalin, das aus dem Nebennierenmark ausgeschüttet wird. Die einzige Ausnahme stellt die sympathische Innervation der Schweißdrüsen dar, hier nutzt auch der Sympathikus den Transmitter Acetylcholin.

Im Folgenden werden nun die Signalübermittlung und die speziellen Rezeptoren des sympathischen Nervensystems näher betrachtet. Die zweiten Neurone des sympathischen Nervensystems verwenden eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen als Transmitter zwischen dem zweiten Neuron und den Erfolgsorganen.

Die Haupttransmitter des sympathischen Nervensystems sind Dopamin, Adrenalin und vor allem Noradrenalin [29]. Parallel zu den Haupttransmittern werden aber noch andere Moleküle in den synaptischen Spalt sezerniert, die als Neuromodulatoren die Signalübertragung beeinflussen und besonders auf die langfristige Signalübertragung Einfluss nehmen. Zu den Co-Transmittern oder Neuromodulatoren zählen Enkephalin, ATP, Neuropeptid Y und Substanz P [27]. Die einzelnen Transmitter besitzen auf den Zielorganen wiederum verschiedene Rezeptoren, an die sie binden und je nach Rezeptor unterschiedliche Wirkungen entfalten können. Die meisten der Transmitter binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die über eine intrazelluläre *second-messenger* Kaskade ihre Wirkung auf die Zelle ausüben [28,29]. Die einzelnen Rezeptoren können dabei entweder eine hemmende oder eine aktivierende Wirkung auf die Zelle haben. Das bedeutet, dass die Wirkung, die ein Transmitter hervorruft, vor allem von der Rezeptorausstattung der einzelnen Zelle und der unterschiedlichen Affinität der Transmitter zu den

unterschiedlichen Rezeptoren abhängt. Ein Transmitter kann also sowohl eine stimulierende als auch eine hemmende Wirkung entfalten.

Bei den Rezeptoren für die Haupttransmitter des sympathischen Nervensystems (SNS) werden Alpha-( $\alpha$ ) und Beta-( $\beta$ ) sowie Dopaminrezeptoren unterschieden.

### 1.2.2 Alpha- und Betarezeptoren

Sowohl der Alpha- als auch der Betarezeptor sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Bei beiden Rezeptortypen existieren mehrere Subtypen, die sich in ihrer Funktion und organspezifischen Verteilung unterscheiden.

Der Betarezeptor wird in die Unterformen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  unterteilt [34]. Beim Alpharezeptor wird zwischen  $\alpha_1$  mit jeweils mehreren Subtypen und dem  $\alpha_2$ -Rezeptor unterschieden.

Adrenalin und Noradrenalin binden mit unterschiedlicher Affinität an die unterschiedlichen Rezeptoren. Adrenalin weist eine höhere Affinität zu den  $\beta$ -Rezeptoren auf, Noradrenalin hingegen bindet bevorzugt an  $\alpha$ -Rezeptoren

und bei deutlich höheren Konzentrationen an  $\beta$ -Rezeptoren [30].

Alle Subtypen des  $\alpha_1$ -Rezeptors sind  $G_Q$ -Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Aktivierung dieses G-Proteins führt zur Aktivierung der Phospholipase  $C\beta$ , die membranständiges Phosphatidylinositoltriphosphat ( $PIP_3$ ) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) spaltet.  $IP_3$  führt zu einer Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), DAG aktiviert die calciumabhängige Proteinkinase C, die durch Phosphorylierungen intrazelluläre Prozesse aktiviert [27,28,31].

Die  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind an  $G_i$ -Proteine gekoppelt. Diese G-Proteine hemmen die Adenylatzyklase und hemmen damit die Bildung des *second-messengers* cAMP [27,28,31].

Die  $\beta$ -Rezeptoren sind  $G_s$ -Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Aktivierung dieses G-Proteins führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, die aus ATP den *second-messenger* cAMP herstellt. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung



weiterer Proteine und Enzyme viele wichtige Prozesse reguliert. Durch die PKA wird zum Beispiel die Aktivität von Ionenkanälen gesteuert, Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels und die Transkription cAMP-abhängiger Gene reguliert.

Es wurde gezeigt, dass auch Zellen des Immunsystems, insbesondere Lymphozyten, den  $\beta_2$ -Rezeptor in ihrer Membran exprimieren und damit durch Adrenalin bzw. Noradrenalin beeinflusst werden können [33,34]. Auch für andere Botenstoffe des SNS exprimieren diese Zellen Rezeptoren [30,35]. Außerdem konnten sympathische Nervenfasern in lymphatischen Organen nachgewiesen werden [32,35]. Die Orte, an denen sich viele Zellen des Immunsystems aufhalten, sind also sympathisch innerviert und die Immunzellen sind in der Lage die Signale des SNS zu empfangen. Zusammengefasst weist dies deutlich auf einen direkten Einfluss des SNS auf das Immunsystem hin.

Während der Einfluss des SNS auf das Immunsystem nimmt, führt eine Aktivierung des Immunsystems auch zu einer Aktivierung des SNS [47,148,156]. Die Aktivierung kann

dabei auf mehreren Ebenen erfolgen. Kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems, werden proinflammatorische Zytokine gebildet und freigesetzt. Die Zytokine, besonders IL-1 und TNF können im ZNS direkt eine Aktivierung des SNS hervorrufen [48,148,156]. Außerdem aktivieren bzw. beeinflussen die lokal gebildeten Zytokine afferente Nozizeptoren und afferente Fasern des Nervus Vagus. Ist das afferente Signal dieser Nerven ausreichend, findet eine Signalübertragung ins ZNS statt, die auch zu einer Aktivierung des SNS führt [48,148,156,157]. Auch auf spinaler Ebene gibt es Verbindungen zwischen dem sensorischen NS und dem SNS durch Interneurone [148,158]. Diese Verbindungen könnten eine lokal begrenzte Aktivierung des SNS ermöglichen [148]. Auf den Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die RA wird weiter unten eingegangen.

#### 1.2.2 Signalweg des $\beta$ -Adrenorezeptors

Alle Subtypen des  $\beta$ -AR bestehen aus sieben Transmembrandomänen [34]. Der N-Terminus des Rezeptors liegt extrazellulär, der C-Terminus im Zytosol.

Die weitere Signaltransduktion in der Zelle ist von heterotrimeren G-Proteinen abhängig. Diese bestehen aus den drei Untereinheiten: alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) und gamma ( $\gamma$ ) [36].

Die  $\alpha$ -Untereinheit ist an die Membran gebunden und hat im inaktiven Zustand GDP gebunden, in aktiviertem Zustand GTP. Die beiden anderen Untereinheiten bilden zusammen einen stabilen Komplex, der ebenfalls Membran-assoziiert ist [36].

Wenn die  $\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden hat, bilden alle drei Untereinheiten einen stabilen Komplex.

Durch Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Schleifen des Rezeptors, die sich auf die intrazellulären Schleifen überträgt. Dadurch wird intrazellulär eine Bindungsstelle für die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins geschaffen; diese bindet an den Rezeptor. Es kommt dadurch zu einer Konformationsänderung, die zur Ablösung von GDP führt [28,37]. Die freie Bindungsstelle wird von GTP eingenommen. Dadurch wird die aktive Konformation der  $\alpha$ -Untereinheit

stabilisiert [28]. Diese Konformationsänderung hat weitere Folgen: die  $\alpha$ -Untereinheit löst sich vom Rezeptor ab, zum anderen vom  $\beta\gamma$ -Komplex [28,37]. An den aktivierten Rezeptor können nun weitere G-Proteine binden und im Sinne einer Signalverstärkung ebenfalls aktiviert werden. In der aktiven Konformation der  $\alpha$ -Untereinheit sind Proteinschleifen exponiert, die mit dem Effektorprotein interagieren und dieses aktivieren. Auch der  $\beta\gamma$ -Komplex ist durch diese Prozesse aktiviert worden. Seine Funktionen sind nicht abschließend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass der aktivierte  $\beta\gamma$ -Komplex ebenfalls zur Signaltransduktion beiträgt.

Die  $\alpha$ -Untereinheit interagiert mit dem Effektorprotein, beim  $\beta_2$ -Rezeptor handelt es sich dabei um die Adenylatzyklase, die ATP in cAMP umwandelt [34,36,37]. cAMP aktiviert die Proteinkinase A.

Diese besteht aus insgesamt vier Untereinheiten, zwei regulatorischen und zwei katalytischen. Die regulatorischen Untereinheiten besitzen Bindungsstellen für je zwei cAMP-Moleküle [28]. Durch die Bindung von

cAMP wird eine Konformationsänderung ausgelöst, die die beiden katalytischen Einheiten als aktive Monomere freisetzt [28]. Die PKA führt durch Phosphorylierung von verschiedenen Enzymen des Stoffwechsels, Ionenkanälen, Enzymen und Proteinen des Zytoskeletts und der intrazellulären Kalziumhomöostase zu den schnell eintretenden Effekten, die durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation hervorgerufen werden.

Durch PKA abhängige Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren CREB (*cAMP responsive element binding protein*) und NF- $\kappa$ B wird eine später einsetzende genomische Wirkung erzielt [28,34].

Allerdings wird nur ein Teil der Effekte, die nach einer Stimulation von  $\beta_2$ -Rezeptoren auftritt, durch die PKA vermittelt. Diese alternativen Signalwege sind Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht bis ins Letzte aufgeklärt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des  $\beta_2$ -Rezeptors auch über die p38 MAP Kinase (*Mitogen activated Kinase*) Einfluss auf die Zellen nimmt [38,39]. Die p38 MAP-Kinase entfaltet ihre Wirkung auf die Zelle

entweder durch die Phosphorylierung anderer zellulärer Kinasen oder durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und steuert so Prozesse der Zelle wie Zellteilung, Genexpression, Apoptose, Stoffwechsel und Differenzierung [39,155].

Die Aktivierung der p38 MAP Kinase kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Einerseits wurde ein PKA abhängiger Mechanismus beschrieben [39]. Die alleinige Erhöhung des intrazellulären cAMP -Spiegels, zum Beispiel durch Stimulation anderer Rezeptoren, führt nicht zu einer Aktivitätssteigerung der p38 MAP-Kinase [39]. Es scheint eine Verknüpfung mit dem  $\beta$ -Adrenorezeptor notwendig zu sein. Andererseits wurden auch PKA unabhängige Mechanismen beschrieben [40]. Die Stimulation des  $\beta$ -Adrenorezeptors führt über die Aktivierung der PKC zu einer Aktivierung der Bruton Tyrosinkinase, die wiederum den MAP Kinase Signalweg aktiviert [34]. Außerdem scheint die „Transaktivierung“ von Rezeptortyrosinkinasen durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des  $\beta$ -Adrenorezeptors eine Rolle bei der Aktivierung des MAP Kinase Signalwegs zu spielen

[37,39]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei der Aktivierung des MAP Kinase Signalwegs auch  $\beta$ -Arrestine eine wichtige Rolle spielen [44]. Im Fall des MAP Kinase Signalpfads bewirkt die Stimulation des  $\beta$ -Adrenorezeptors eine Rekrutierung von c-Src zum Arrestin, wodurch der MAP-Kinase Signalweg aktiviert werden kann [44].

### 1.2.3 Arrestine

Von den Arrestinen sind mehr als fünf verschiedene Subtypen charakterisiert worden. Die höchste Affinität für den  $\beta_2$ -Rezeptor hat  $\beta$ -Arrestin 2 [41]. Dieses kann an den  $\beta$ -Rezeptor binden, nachdem dieser von der GRK-2 (G-Protein Rezeptor Kinase 2) phosphoryliert wurde. Diese Kinase gehört zu einer Proteinfamilie, zu der bisher mehr als fünf Subtypen zugeordnet werden konnte. Die GRK's phosphorylieren intrazelluläre Domänen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und tragen damit zur Signalübertragung und zur Regulation des Rezeptors bei. Im Zusammenhang mit dem  $\beta_2$ -Rezeptor spielt die GRK2 die wichtigste Rolle [37]. Durch die Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRK2 wird einerseits die

Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein schlechter, was zur Desensibilisierung des Rezeptors führt (siehe unten) [37]. Zum anderen kann  $\beta$ -Arrestin 2 an den phosphorylierten Rezeptor binden [42]. An den Rezeptor gebundenes  $\beta$ -Arrestin 2 kann zu verschiedenen nachfolgenden Prozessen führen: die Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein wird schlechter [43], die Internalisierung des Rezeptors [42,43,45] und die Initiierung von Signalwegen [37,40,41,42,43,44,45] wird ermöglicht.

Bei der  $\beta$ -Arrestin abhängigen Signaltransduktion dient das  $\beta$ -Arrestin als *scaffold*-Protein, das mit mehreren Proteinen einer Signalkaskade interagiert und die verschiedenen Reaktionspartner in räumliche Nähe bringt [42]. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene MAP-Kinasen, wie die *extracellular regulated kinase* 1/2 (ERK 1/2) durch diesen Signalweg aktiviert werden können [40,41,42,43,44,45].

Um sicherzustellen, dass die extrazellulären Signale in adäquater Höhe und Spezifität in die Zelle übertragen werden, ist die exakte Regulierung des Rezeptorsystems



notwendig. Dazu stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Desensitisierung des Rezeptors, Internalisierung oder genomische Down-Regulation des Rezeptors [37].

Bei der Desensitisierung wird die Kopplung zwischen Rezeptor und nachgeschaltetem G-Protein durch Phosphorylierung abgeschwächt. Dadurch wird das extrazelluläre Signal weniger effektiv in die Zelle übertragen und insgesamt abgeschwächt [37,43,45]. Die Rezeptorphosphorylierung kann von mehreren Kinasen katalysiert werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei auch die PKA und die PKC [37]. Ebenso trägt  $\beta$ -Arrestin, das an den Rezeptor gebunden ist, zur Desensibilisierung bei. Außerdem kann  $\beta$ -Arrestin mit der Phosphodiesterase 4D, die cAMP in AMP spaltet, interagieren. Diese Interaktion führt zu einer Funktionssteigerung der Phosphodiesterase; der *second-messenger* cAMP wird nach seiner Bildung wieder gespalten [46].

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Signaltransduktion ist die Internalisierung der

Rezeptoren. Auch bei diesem Vorgang spielt  $\beta$ -Arrestin eine wichtige Rolle. Die  $\beta$ -Arrestine dienen dabei als Adapter für die Endozytose-Maschinerie und für die Ubiquitinierungs-enzyme, die für den Abbau im Proteasom notwendig sind [43, 44].

Auch die genomische Downregulation, die zu einer Abnahme der Zahl an Rezeptoren pro Zelle führt, trägt zur Regulation der Signalübertragung bei [37].

#### 1.2.4 Das sympathische Nervensystem und rheumatoide Arthritis

Das sympathische Nervensystem ist in der Lage Einfluss auf das Immunsystem auszuüben [30,32,33,34,35]. Die Transmitter des SNS erreichen die Immunzellen dabei über zwei Wege, zum einen aus postganglionären Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems, die bis in die sekundären lymphatischen Organe ziehen [32,35], zum anderen über die Blutbahn durch Katecholamine aus dem Nebennierenmark.

Die Rezeptorausstattung der Immunzellen ist nicht einheitlich. In besonderem Maße wird der  $\beta_2$ -Rezeptor auf den Immunzellen exprimiert [47]. Auch eine

differenzierte Expression des  $\alpha_1$ -Rezeptors auf Zellen des Immunsystems ist beschrieben [48]. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Rezeptorexpression je nach Gewebe unterscheidet [48].

Die Wirkung der Transmitter des SNS ist dabei stark vom Kontext abhängig und kann nicht einheitlich als pro- oder antiinflammatorisch bezeichnet werden [50,51]. Speziell wird die Proliferation von T-Zellen gehemmt [52], in Lymphozyten Apoptose induziert und die Organverteilung der Immunzellen beeinflusst [53].

Unter dem Einfluss von Noradrenalin steigt die Anzahl von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im peripheren menschlichen Blut vorübergehend an [54], bei längerer Stimulation sinkt die Anzahl dieser Zellen jedoch wieder ab [54]. Während der Einfluss von Noradrenalin auf die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten differenziert erscheint, wird die CD4<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation durch noradrenerge Stimulation verkleinert [54], während die Anzahl der peripheren B-Zellen durch diese Stimuli unbeeinflusst bleibt [54].

Die Funktion der verschiedenen Zellen wird durch das sympathische Nervensystem ebenfalls beeinflusst. So ist Noradrenalin in der Lage, die LPS induzierte TNF $\alpha$  Sekretion von Makrophagen deutlich zu senken [47]. Auch die Menge von IL-1 wird durch noradrenerge Stimulation gesenkt [35,47]. Durch Transmitter des SNS wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine gehemmt, auf der anderen Seite wird durch dieselben Transmitter die Produktion antiinflammatorischer Zytokine, besonders von IL-10 gesteigert [35,50]. Unter dem Einfluss von Botenstoffen des SNS wird außerdem die Antikörperproduktion und Isotyp-Zusammensetzung beeinflusst [47,56]. So steigert ein  $\beta_2$ -Stimulus zusammen mit CD86 die IgG1 Produktion [47]. Diese Veränderung wird über den cAMP abhängigen Transkriptionsfaktor CREB vermittelt [47]. Ein  $\beta_2$ -adrenerger Stimulus kann aber auch über PKA unabhängige Signalwege, durch die Stimulation der MAP-Kinase p38 zu einer erhöhten IgE Produktion durch B-Zellen führen [38].

Im Zusammenhang mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass der Sympathikotonus bei Patienten, die an RA leiden, erhöht ist [55,57]. In Kombination mit der Tatsache, dass das SNS Einfluss auf die Zellen des Immunsystems nehmen kann, könnte das SNS also auch den Verlauf der rheumatoiden Arthritis beeinflussen. Die Rolle des Sympathikus muss jedoch differenziert betrachtet werden, da sich in vivo zeigt, dass das SNS keine rein antiinflammatorische Wirkung entfaltet. Im Mausmodell der Kollagen Typ II induzierten Arthritis konnte nachgewiesen werden, dass in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer das SNS sowohl eine proinflammatorische als auch eine antiinflammatorische Wirkung hat [58]. In diesem Modell der RA werden die Mäuse mit bovinem Kollagen II immunisiert und so eine experimentelle Arthritis hervorgerufen, die in ihrer Ausprägung und dem Gelenkbefall der humanen RA sehr ähnlich ist. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Sympathektomie bei bereits bestehenden klinischen Symptomen zu einer anschließenden Verschlechterung

der Arthritis führt. Wurde das SNS bereits vor der Induktion der experimentellen Arthritis ausgeschaltet, führte dies zu einem milderem Krankheitsverlauf. Sympathische Neurotransmitter scheinen also in der Initialphase eine entzündungsfördernde und in der Spätphase eine antiinflammatorische Wirkung zu entfalten.

Im Synovialgewebe [59,148] von chronisch entzündeten Gelenken und in sekundären lymphatischen Organen [148,151] nimmt die Dichte an sympathischen Nervenendigungen ab. Während die Dichte sympathischer Nervenendigungen in den entzündeten Geweben abnimmt, steigt die Anzahl Tyrosinhydroxylase positiver Zellen (TH+ Zellen) [153,154]. Diese könnten einen Mechanismus zur Kompensation der geringeren Zahl sympathischer Nervenendigungen darstellen, da sie in der Lage sind selbst Katecholamine zu produzieren [156].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die GRK in Zellen des Immunsystems im Verlauf der adjuvant-induzierten Arthritis herunter reguliert wird [71]. Dies

könnte einen möglichen Kompensationsmechanismus für die gesunkenen Noradrenalin Spiegel in den entzündeten Gebieten darstellen, da durch die Downregulation der GRK die Empfindlichkeit der  $\beta$ -Rezeptoren weniger stark abgeschwächt wird und zusätzlich weniger Rezeptoren internalisiert werden (siehe oben).

Die ambivalente Wirkung des sympathischen Nervensystems im Verlauf der RA ist noch nicht völlig verstanden. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass in der Frühphase der Entzündung das SNS aktiviert wird, um durch eine verstärkte und verbesserte Migration der Immunzellen in die Entzündungsherde, eine gesteigerte systemische Zirkulation und die Bereitstellung von Energie eine möglichst effektive Entfernung des auslösenden Antigens zu bewirken [156]. Lokal scheint die Wirkung des SNS in Summe eher antiinflammatorisch zu sein [156]. Unter diesem Aspekt erscheint auch der Rückgang der sympathischen Nervenendigungen in den entzündeten Geweben sinnvoll. Eine Erklärung für die spätere antiinflammatorische Wirkung des SNS bzw. die verstärkte Entzündung nach

Sympathektomie in der Spätphase der CIA könnte das Auftreten der TH<sup>+</sup> Zellen sein. Ebenso wie die Nervenendigungen des SNS werden diese durch eine medikamentöse Sympathektomie ausgeschaltet [153,156] und sind dann nicht mehr in der Lage durch die Bereitstellung von Katecholaminen  $\beta_2$ -AR induzierte antiinflammatorische Effekte hervorzurufen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von B-Zellen antiinflammatorisches IL-10 nach einem  $\beta_2$ -AR Stimulus zu produzieren im Verlauf der CIA zunimmt [60].

## 1.3 Die B-Zelle

### 1.3.1 Grundlagen

Das gesamte Immunsystem des Menschen wird in zwei große Teile untergliedert. Für eine effektive Immunabwehr müssen beide Teile eng ineinandergreifen. Kommt der Körper mit einem Antigen in Kontakt wird zuerst das angeborene Immunsystem aktiviert. Das angeborene Immunsystem besteht zum einen aus der Barriere zwischen dem Menschen und seiner Umgebung (Haut, Schleimhäute, pH-Barrieren), dem löslichen



Komplementsystem, den Akute-Phase Proteinen und verschiedenen Zelltypen des Immunsystems. Zu den Zelltypen des angeborenen Immunsystems gehören: Granulozyten, Mastzellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen [6]. Beim zellulären Teil des angeborenen Immunsystems spielen sogenannte *Toll-like Rezeptoren* (TLR), die unspezifisch pathogene Muster auf Antigenen erkennen, eine wichtige Rolle.

Nachdem die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert wurden, reagieren sie unter anderem mit der Ausschüttung von Zytokinen, die weitere Zellen des angeborenen aber auch erworbenen Immunsystems anlocken und aktivieren. Außerdem werden Antigene in die Zelle aufgenommen, prozessiert und dann auf spezialisierten Proteinen (MHC II) den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören die T-Zellen und die B-Zellen. Unter dem Einfluss vieler verschiedener Faktoren kann die Immunantwort dabei mehr in Richtung der B-Zellen oder in Richtung einer T-

Zell dominierten Immunantwort verschoben werden. Der ausschlaggebende Faktor ist dabei, welche Subpopulation von T-Helferzellen die Immunantwort dominiert. Überwiegen die Th1- Zellen wird die Immunreaktion mehr in Richtung von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen zur Abwehr intrazellulärer Erreger verlagert. Dominieren die Th2-Zellen wird die Antikörperbildung durch B-Zellen gegen extrazelluläre Erreger angeregt.

Um eine adäquate, ausreichende, aber nicht überschießende Immunantwort zu gewährleisten, muss die Aktivierung der Immunzellen streng reguliert werden. Die Aktivierung der B-Zellen kann dabei je nach Antigen sowohl T-Zell abhängig als auch unabhängig von den T-Zellen erfolgen [6].

Die T-Zell unabhängige B-Zell Aktivierung hängt von sogenannten *thymus independent* Antigenen (TI-Antigene) ab. Dabei werden Substanzen unterschieden, die entweder direkt die Proliferation von B-Zellen auslösen können, insbesondere LPS in hohen Konzentrationen, oder Antigene, die reife B-Zellen durch

Bindung an den B-Zellrezeptor aktivieren können, vor allem bakterielle Polysaccharide. Diese Form der T-Zell-unabhängigen B-Zell Immunantwort ist besonders wichtig für die Abwehr von bekapselten Bakterien. Ein Ausfall dieser Immunantwort durch eine Milzresektion kann zu lebensbedrohlichen generalisierten Infektionen führen (OPSI) [6].

Bei der T-Zell abhängigen B-Zellaktivierung sind zwei Schritte notwendig. Zum einen erkennt die B-Zelle mit ihrem B-Zellrezeptor, einem membranständigen Immunglobulin, ein spezifisches Epitop eines größeren Antigens. Das gesamte Antigen wird daraufhin internalisiert und durch lysosomale Reaktionen in kleinere Stücke zerlegt. Diese werden auf MHCII Molekülen an der Oberfläche der B-Zelle präsentiert.

Nun kann eine T-Zelle mit ihrem T-Zellrezeptor (TCR) an dieses im MHCII Komplex präsentierte Molekül binden.

Der T-Zellrezeptor ähnelt im Aufbau dem  $F_{ab}$ -Fragment eines Antikörpers. Er hat nur eine Bindungsstelle und ist, wie auch der B-Zellrezeptor, spezifisch für ein

bestimmtes Epitop. Ein wichtiger Bestandteil des TCR ist das CD3 Molekül, das spezifisch für T-Lymphozyten ist. Außerdem ist der TCR je nach Subpopulation mit einem CD4 oder einem CD8 Molekül assoziiert. Durch diesen speziellen Aufbau wird gewährleistet, dass T-Lymphozyten durch Antigene nur dann aktiviert werden, wenn diese auf MHC Molekülen präsentiert werden [6]. Der T-Zellrezeptor von T-Helferzellen ist mit dem CD4 Molekül assoziiert und wird daher durch Antigene aktiviert, die auf MHCII Molekülen dargeboten werden. Durch diese Bindung wird die T-Zelle aktiviert und exprimiert co-stimulatorische Moleküle in ihrer Membran. Das wichtigste darunter ist der CD40 Ligand [6], der mit dem CD40 Molekül in der Membran der B-Zellen interagiert. Außerdem schüttet die T-Zelle nach ihrer Aktivierung Zytokine (vor allem IL-4) aus, die zusammen mit dem CD40L zur weiteren Aktivierung und klonalen Proliferation der B-Zellen und Differenzierung zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen führt. Die B-Zellen beginnen nun Immunglobuline zu sezernieren, deren Bindungsstellen identisch mit der

Bindungsstelle des BCR der entsprechenden B-Zelle sind. Zu Beginn der Immunreaktion produzieren die B-Zellen Immunglobulin M (IgM). Im Verlauf der Immunreaktion wird durch einen *Isotypen-Switch* IgG gebildet. Die B-Zellen produzieren aber nicht nur Antikörper, sondern sezernieren auch Zytokine. Einige der B-Zellen differenzieren sich zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei einem zweiten Kontakt mit „ihrem“ Antigen sofort in der Lage sind, hochspezifische IgG zu bilden. Je nach Reifungszustand einer B-Zelle exprimiert diese verschiedene Oberflächenmarker in ihrer Membran. Dazu gehören CD19 (wird von allen B-Zellen exprimiert), CD20, CD138 (wird von Plasmazellen exprimiert) und B220.

### 1.3.2 Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die B-Zelle

Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen  $\beta_2$ -Rezeptoren in ihrer Membran exprimieren, diese Rezeptoren funktionstüchtig sind und nachgeschaltete Signalwege in der Zelle aktivieren [33,34,38,61,62,63]. Dabei werden sowohl der cAMP/PKA/CREB als auch der p38 MAP-

Kinase Signalweg stimuliert [38,62]. Die Anwesenheit von  $\alpha$ -Rezeptoren auf B-Zellen wird kontrovers diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Noradrenalin die Produktion von IgG1 und IgE durch B-Zellen gesteigert wird [38,47]. Außerdem wurde gezeigt, dass nachfolgend auf eine Stimulation des  $\beta_2$ -Rezeptors die Expression von CD86 Molekülen auf B-Zellen steigt [47,64]. Dies ist im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation durch B-Zellen von Bedeutung, da mehr CD86 zu einer effektiveren Stimulation von T-Zellen durch B-Zellen führt [18]. Hinzu kommt, dass eine Stimulation des CD86 Moleküls zu einer Steigerung der IgG1- und IgE-Bildung durch B-Zellen führt [65]. Ein weiterer Einflussfaktor des SNS auf die B-Zellfunktion ist die Tatsache, dass in der Promotorregion des MHCII Moleküls CREB Bindungsstellen vorhanden sind [66,67]. Wie oben dargestellt wurde, ist das cAMP/PKA/CREB System eine Möglichkeit des SNS durch einen  $\beta$ -adrenergen Stimulus Einfluss auf die Transkription zu nehmen.

Ein ähnlicher Zusammenhang zeigt sich in Bezug auf die Regulation des antiinflammatorisch wirksamen Zytokins IL-10 (siehe unten).

Das sympathische Nervensystem nimmt also über  $\beta_2$ -Rezeptoren direkten Einfluss auf die wichtigsten drei B-Zellfunktionen: die Antikörperproduktion, die Antigenpräsentation und die Bildung von Zytokinen.

Allerdings übt das SNS auch über andere Transmitter und Rezeptoren Einfluss auf die Funktion und Aktivität der B-Zellen aus [18]. Da diese für die vorliegende Arbeit aber weniger von Bedeutung sind, wird hier nur auf die Einflüsse des  $\beta$ -adrenergen Systems eingegangen.

### 1.3.3 Die B-Zelle in der RA

Spätestens seit dem Erfolg der B-Zell-Depletion zur Behandlung der RA ist die Beteiligung der B-Zellen in die Pathogenese der Erkrankung klinisch gesichert [72,73].

Die Rolle der B-Zellen in der RA soll anhand der drei Hauptaufgaben der B-Zellen, Antikörperproduktion, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation dargestellt werden.

Für eine Rolle der B-Zellen spricht der Nachweis von Autoantikörpern, die zum Teil schon vor dem Auftreten klinischer Symptome nachgewiesen werden können. Zu diesen Autoantikörpern zählen die Rheumafaktoren, anti-CCP-AK und Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin.

Im Tiermodell wird zur Induktion der Arthritis durch Injektion von bovinem Kollagen Typ II die Bildung von Antikörper gegen Kollagen II induziert. Interessanterweise können diese Antikörper gegen dieselben Epitope des Kollagen Typ II (CII) auch beim Menschen nachgewiesen werden [74,75]. Da diese Unterform des Kollagens vor allem im Gelenkknorpel vorkommt, könnten diese Antikörper auch eine pathogenetische Wirkung haben. Durch die Bindung dieser Antikörper an Strukturen in den betroffenen Gelenken wird die inflammatorische Reaktion durch die Aktivierung von Komplement- und Immunzellen verstärkt und aufrechterhalten. Die pathogenetische Rolle dieser Antikörper zeigt sich auch in der Tatsache, dass in



Mäusen nur durch Injektion von anti-CII-Antikörpern eine Arthritis ausgelöst werden kann [80].

Im Zusammenhang mit (Auto)- Antikörperphänomenen bei der RA ist auch das Immunglobulin E (IgE) zu erwähnen. Es besteht eine Assoziation zwischen erhöhten IgE Spiegeln und extraartikulären Manifestationen bei der RA [76]. In diesem Zusammenhang ist die Rolle der Mastzellen zu erwähnen. Diese sind mit IgE Rezeptoren ausgestattet und es konnte gezeigt werden, dass dieser Zelltyp eine Rolle in der Pathogenese durch Sekretion von z.B. Histamin und TNF einnimmt [77,147].

Es muss aber betont werden, dass es keinen Antikörper gibt, der für sich genommen pathognomonisch ist und bei allen Erkrankten nachgewiesen werden kann, wie es bei anderen Autoimmunerkrankungen der Fall ist. Damit stellt sich die Frage, ob die beschriebenen Antikörper ursächlich an der Entstehung der RA beteiligt sind, oder eine Begleiterscheinung der Immunreaktion darstellen [78]. Hierfür spricht, dass RF auch bei anderen Erkrankungen wie der chronischen Virushepatitis C nachgewiesen werden können [79]. Allerdings besteht

aber auch die Möglichkeit, dass es nicht den einen Antikörper oder ein einziges Epitop gibt, das spezifisch für die RA ist, sondern mehrere verschiedene, die sich auch von Patient zu Patient unterscheiden können [56,78].

Neben der Produktion von Antikörpern, sezernieren die B-Zellen Zytokine und nehmen damit Einfluss auf die inflammatorische Reaktion.

Es ist bekannt, dass B-Zellen die Zytokine IL-2, Interferon- $\gamma$ , IL-12, IL-4, TNF, TGF- $\beta$ , IL-10 und IL-6 produzieren [81,83,83,84,85]. Je nach sezerniertem Zytokinmuster werden die B-Zellen analog zur Unterteilung der T-Zellen in regulatorische B-Zellen (IL-10, TGF- $\beta$ ), Effektor B-Zellen: Be1 (IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF) und Be2- Zellen (IL-2, IL-4, TNF, IL-6) unterteilt [18]. Die B-Zelle darf also nicht nur als ausführendes Element, sondern muss differenzierter als steuernde Zellgruppe gesehen werden [18].

Vor allem die Zytokine IL-6, IL-10 und TNF, die auch von den B-Zellen gebildet werden spielen bei der RA eine Rolle [10,56].

TNF ist ein starkes Chemokin und Aktivator von Makrophagen [24,89,90]. Durch TNF stimuliert, bilden die Makrophagen IL-1 und ebenfalls TNF, wodurch weitere Makrophagen angelockt und aktiviert werden. Die Blockade von TNF reduziert viele proinflammatorische Zytokine in den betroffenen Gelenken [24,56,86]. Im Mausmodell führte die Behandlung mit TNF inhibierenden Substanzen zu einer verminderten Entzündung und Gelenkschädigung [87,88]. Letztlich zeigt sich die Bedeutung von TNF auch in der Wirksamkeit der TNF inhibierenden Therapie bei Menschen [6,56,91].

Auch IL-6 spielt in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle. Dies zeigt sich an den hohen IL-6 Serumspiegeln von Patienten mit RA sowie im Mausmodell [92,93,94] und der Korrelation zwischen den IL-6 Serumspiegeln und dem Titer der Rheumafaktoren [95,96]. Weiter konnte der Einfluss von IL-6 auf die RA in Experimenten nachgewiesen werden, bei denen Mäuse ohne IL-6 einen milderen und

verzögerten Verlauf der Arthritis zeigten [97,98]. Auch der Erfolg der Anti-IL-6 Therapie zeigt den Einfluss auf die RA [99]. Diese Therapie führt zu einer deutlichen Abnahme von Gedächtniszellen, anderen B-Zell-Subpopulationen und der IgG und IgA Titer im Serum der behandelten Patienten [100]. Beim IL-6 System zeigt sich im Zusammenhang mit der B-Zellfunktion noch eine Besonderheit. IL-6, das von den B-Zellen gebildet und sezerniert wird, aktiviert die B-Zellen und führt zu einer polyklonalen B-Zellvermehrung und einer gesteigerten Antikörperproduktion [101]. Damit könnte sich in den betroffenen Gelenken eine Art autokriner Mechanismus ausbilden, der zu einer Selbstaufrechterhaltung der B-Zellaktivierung [101] führt.

Ein weiteres Zytokin, das eine wesentliche Rolle bei der regulatorischen B-Zellfunktion spielt ist das IL-10 (siehe auch unten). Während IL-6 und TNF proinflammatorisch wirksam sind, zeigt IL-10 eine eher immunsupprimierende Wirkung [102]. In Bezug auf die Funktion der B-Zellen hat IL-10 aber auch stimulierende Effekte. So verhindert IL-10 die Apoptose, verstärkt

Proliferation, Differenzierung und MHC II Expression der B-Zellen. Außerdem scheint IL-10 eine Rolle beim Immunglobulin Isotypen-switch zu spielen [103,104,105,106]. IL-10 kann im Serum, Synovialgewebe und der Synovialflüssigkeit von Rheumapatienten nachgewiesen werden. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen den IL-10 Spiegeln und dem Titer der RF [107,108]. Dies könnte mit den oben beschriebenen stimulierenden Effekten auf die B-Zellen erklärt werden. IL-10 scheint aber auch hemmende Einflüsse auf B-Zellen auszuüben. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine systemische Behandlung mit IL-10 zu verminderten Anti-CII-Antikörperspiegeln führt und die Symptome der Arthritis milder ausfallen [109]. Dieser positive Einfluss des IL-10 auf den Progress der Arthritis wurde mehrfach in verschiedenen Studien nachgewiesen [109,110,111,112,113,132]. Auch der regulatorische und antiarthritische Effekt von IL-10 produzierenden B-Zellen konnte gezeigt werden [114,132].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der B-Zellfunktion im Kontext der RA ist die Antigenpräsentation durch B-Zellen.

B-Zellen zeigen bestimmte Eigenschaften, die sie von anderen APC abgrenzen und die B-Zellen prädestinieren, die entscheidenden APCs in der Autoimmunität zu sein [18].

B-Zellen erkennen und nehmen das Antigen mit ihrem hochaffinen BCR auf, und präsentieren es nach Prozessierung auf MHC-II Molekülen. Durch die hohe Affinität des BCR sind bereits geringste Mengen des Antigens ausreichend, um spezifische T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen [56]. Außerdem tragen die B-Zellen mit ihrem hochaffinen BCR zum *antigen-spreading* bei [116]. Das bedeutet, dass im Verlauf der Immunreaktion verschiedene Antikörper gegen verschiedene Epitope desselben Antigens, bzw. ähnliche Antigene gebildet werden [116]. In diesem Prozess spielt möglicherweise der affine BCR eine wichtige Rolle. Es wird diskutiert, dass wegen der hohen Affinität des BCR zum Antigen, Regionen, die in der Nähe der

Bindungsstelle sind, nicht prozessiert werden. Dies führt letztendlich dazu, dass Epitope, die von der Bindungsstelle entfernt sind, bevorzugt präsentiert werden [117,118,119].

Zur Aktivierung der Antigenpräsentation durch B-Zellen ist eine Co-Stimulation durch den CD40L auf CD4+ T-Zellen erforderlich [56,115]. Fehlt diese Co-Stimulation induzieren die B-Zellen in den T-Zellen eher Toleranz als Aktivierung [120,121]. Es ist also notwendig, dass T-Zellen bereits zuvor, zum Beispiel durch andere APCs, aktiviert wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die B-Zelle in der Pathogenese und im Verlauf der RA eine wichtige Rolle einnimmt. Die Funktion der B-Zellen kann jedoch nicht pauschal als pro- oder antiarthritisch beschrieben werden. So verläuft die Arthritis im Mausmodell schwerer, wenn vor der Induktion die B-Zellen ausgeschaltet wurden [122,123], was die antiinflammatorische und regulatorische Funktion der B-Zellen untermauert.

## 1.4 Interleukin 10

Die Rolle des IL-10 in der RA wurde oben beschrieben. Im Folgenden soll nun die Biologie des IL-10, vor allem die Regulation und Induktion, dargestellt werden.

Das menschliche Interleukin 10 ist ein 35kD Homodimer, bestehend aus zwei nicht kovalent gebundenen Ketten [102].

IL-10 wird im Menschen von Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Dendritischen Zellen, Granulozyten und B-Zellen gebildet [102,131]. Makrophagen und Monozyten sezernieren IL-10 nach Aktivierung mit LPS via TLR-4 und ERK-Kinase; nach Stimulation mit Katecholaminen via PKA und CREB durch Induktion der Transkription [102]. Diese Zellen sezernieren IL-10 auch während der Beseitigung apoptotischer Zellen in einem Prozess, der von der p38 MAP-Kinase abhängt [124,126,129]. T-Zellen sezernieren IL-10 nach Stimulierung des TCR und einer Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinase [125].

Das IL-10 Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert, umfasst 5,1 Kilobasenpaaren und umschließt fünf Exons



[127,128]. In der Promotorregion des IL-10 Gens befinden sich Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Beim Menschen konnten dabei Bindungsstellen für diese Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden: Sp1, STAT, C/EBP, IRF's, AP-1, c-MAF, NF- $\kappa$ B und PbxI [126,128,129]. Die p38 MAP-Kinase spielt durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sp1 eine Rolle bei der Transkription von IL-10. Es konnte gezeigt werden, dass die IFN- $\alpha$  induzierte IL-10 Transkription in B-Zellen von *STAT-binding- elements* abhängt [130]. Außerdem konnten vier CREB-Bindungsstellen nachgewiesen werden [18,68,69,70,128]. Allerdings sind nur die Regionen CRE1, CRE3 und CRE4, nicht aber CRE2 in der Lage Protein-DNA-Komplexe zu bilden [128]. Die IL-10 Transkription kann durch die CREB-Bindungsstellen in der Promotorregion durch  $\beta$ -adrenerge Stimuli induziert werden. Es wurde gezeigt, dass ein gesteigerter intrazellulärer cAMP Spiegel zu einer gesteigerten IL-10 Produktion führt [18,60,68,69,70]. In

diesem Prozess spielt die Proteinkinase A eine entscheidende Rolle [60].

Das sezernierte IL-10 bindet an den IL-10 Rezeptor. Dieser besteht aus zwei verschiedenen Ketten [102]. Der funktionelle Rezeptor besteht aus zwei Heterodimeren, die jeweils aus den Untereinheiten IL-10R1 und IL-10R2 bestehen [128]. Die Bindung von IL-10 an den Rezeptor aktiviert die Janus Tyrosin Kinasen JAK 1 und Tyk2, die mit den Monomeren assoziiert sind [128]. Diese phosphorylieren zytoplasmatische Regionen der Untereinheiten. Dies führt zu einer Rekrutierung von STAT 3 an die IL-10 R1 Rezeptoruntereinheit und einer Homodimerisierung von STAT3 Monomeren nach deren Phosphorylierung [128].

Die STAT 3 Homodimere können sich nun vom Rezeptor lösen, in den Kern translozieren und dort an STAT-bindende Elemente in den Promotorregionen verschiedener Gene binden [102,128,136]. Eines dieser Gene ist das IL-10 selbst, das durch STAT verstärkt transkribiert wird [102,128,137]. Außerdem wird der *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS) induziert

[102,128]. Durch IL-10 wird zudem der NF $\kappa$ B Signalweg an verschiedenen Stellen inhibiert [102,128,134,135]. Wahrscheinlich ist insbesondere dieser Effekt für die breite immunsupprimierende Wirkung von IL-10 verantwortlich [128]. Die immunsupprimierende Wirkung geht dabei besonders auf diese Effekte zurück: Inhibition der Antigenpräsentation, Zytokinausschüttung und Phagozytose der Makrophagen und Monozyten [102,138,139,140]. Gleichzeitig wird in diesen Zellen durch IL-10 deren Toleranz-induzierende und inhibitorische Funktion verstärkt [102]. Auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch IL-10 inhibiert [102,142], während IL-10 keinen direkten Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat [102,141]. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch neutrophile Granulozyten wird durch IL-10 unterbunden [102,128]. In Kombination mit IL-4 unterdrückt IL-10 die Mastzellentwicklung [102]. Allerdings hat IL-10 nicht nur immunsupprimierende Effekte, sondern kann auf bestimmte Zelltypen auch aktivierend wirken. Wie oben beschrieben, hat IL-10 positive Effekte auf die B-Zell Funktion [siehe oben].

Zudem stimuliert IL-10 die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen [133].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das IL-10 Gen mehrere CREB- Bindungsstellen in der Promotorregion hat und durch Substanzen, die den cAMP-Spiegel in der Zelle erhöhen, induziert werden kann. Auch die p38 MAP-Kinase ist in die Regulation der IL-10 Transkription involviert [124, 125, 126]. Die biologischen Effekte von IL-10 betreffen verschiedene Zelltypen und sind meist immunsupprimierend.

Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin 10 bei Erkrankungen mit gestörter Immuntoleranz, wie der RA, einen positiven Effekt auf die Symptome und die Erkrankung hat [109,114].

## 1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Einflüsse des Sympathikus auf die B-Zellen bei chronisch entzündlichen Erkrankungen zu charakterisieren.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation von  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren auf Milz -B-Zellen aus immunisierten Mäusen die IL-10 Produktion dieser B-Zellen steigert [132]. Weiter sind B-Zellen in der Lage, die Arthritisprogression zu stoppen und damit in der CIA anti-entzündlich wirken. Interessanterweise kann die IL-10 Produktion durch einen  $\beta_2$ -AR Stimulus nur gesteigert werden, wenn B-Zellen aus immunisierten Tieren und nicht aus naiven Tieren verwendet werden. Die Mechanismen hinter dieser Dichotomie sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet werden.

Dazu soll folgende Hypothese untersucht werden: Es findet eine Veränderung der Sensitivität der B-Zelle gegenüber einem definierten sympathischen Stimulus und/oder der  $\beta_2$ -AR nachgeschalteten intrazellulären Signalpfade im Verlauf der CIA so statt, dass eine Steigerung der IL10 Produktion durch  $\beta_2$ -Stimulus möglich wird.

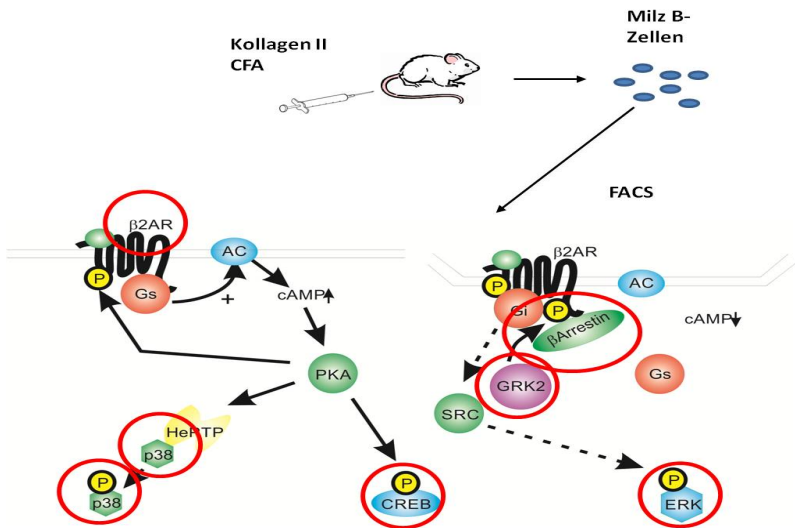
## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

Um die gestellte Hypothese zu belegen, wurde eine Methode entwickelt, die sich aus mehreren Schritten zusammensetzt. Grundlage des Experiments ist die experimentelle Induktion einer Arthritis bei Mäusen (siehe Haltung der Mäuse und Induktion der experimentellen Arthritis).

Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Arthritis getötet und die Milz entfernt. Aus der Milz wurden die Milz B-Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert (siehe Isolierung der B-Zellen).

Im ersten Versuchsteil wurden die B-Zellen nach der Isolierung fixiert (siehe FACS-Färbungen). Mittels FACS wurden dann Veränderungen im Signalpfad des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors untersucht.

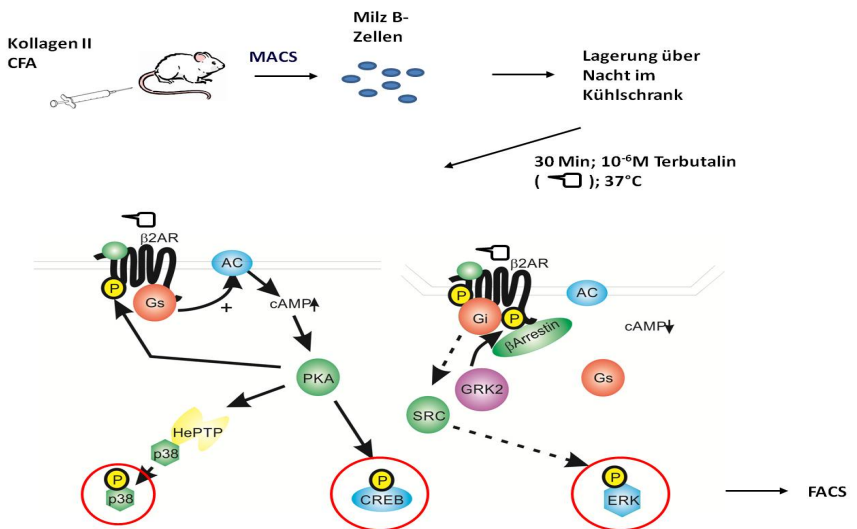


**Abbildung 1 Schematische Darstellung der angewendeten Methode.**

Abbildung modifiziert nach Pongratz G. Rot eingekreist sind die Proteine im Signalpfad des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors, die in der vorliegenden Arbeit mittels FACS untersucht wurden. AC: Adenylatzyklase; cAMP: *cyclic Adenosinmonophosphat*; PKA: Proteinkinase A; GRK2: G-Proteinrezeptorkinase 2; SRC: SRC-Kinase; p38: p38 MAP Kinase; CREB: *cAMP responsive element binding protein*; ERK: *extracellular signal regulated kinase*

Neben dem  $\beta_2$ -Adrenorezeptor wurde auch die Expression des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors untersucht und intrazelluläre Färbungen auf Interleukin 10 durchgeführt.

In einem zweiten Versuchsteil wurden die B-Zellen nach der Isolation über Nacht im Kühlschrank gelagert und dann für 30 Minuten mit  $10^{-6}\text{M}$  Terbutalin bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert (siehe Aufbau Stimulationsversuch). Anschließend wurden die B-Zellen ebenfalls fixiert und mit FACS-Färbungen die phosphorylierten Formen der Second-Messenger detektiert.



**Abbildung 2 Schematische Darstellung des Stimulationsversuchs.**

Abbildung modifiziert nach Pongratz G. Rot eingekreist sind die phosphorylierten Formen den Second-



Messenger, die mit FACS nach einer 30minütigen Stimulation mit  $10^{-6}$ M Terbutalin untersucht wurden. AC: Adenylatzyklase; cAMP: *cyclic Adenosinmonophosphat*; PKA: Proteinkinase A; GRK2: G-Proteinrezeptorkinase 2; SRC: SRC-Kinase; p38: p38 MAP Kinase; CREB: *cAMP responsive element binding protein*; ERK: *extracellular signal regulated kinase*;

### 2.1.1 Haltung der Mäuse

Alle Versuche wurden mit männlichen DBA1 Mäusen (6-8 Wochen, *Elevage Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich*) durchgeführt. Gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes wurden die Tiere bei einer Raumtemperatur von 22°C, einem 12 stündigen Tag-Nachtrhythmus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Versuche wurden durch die Regierung der Oberpfalz genehmigt (AZ: 54-2532.1-09/14).

### 2.1.2 Induktion der experimentellen Arthritis und Erstellung des klinischen Scores

Die experimentelle Arthritis wurde an Tag 0 durch intradermale Injektion einer Emulsion (100µg bovines Kollagen II (*Chondrex, Redmond, Washington*) emulgiert in einem gleichen Volumenanteil komplettes Freund's

Adjuvant (*Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland*) in die Schwanzwurzel induziert.

Der klinische Score (Tabelle 1) wurde jeweils vom gleichen Untersucher zur gleichen Tageszeit (8.00-9.00 Uhr) erhoben. Dabei wurden jeweils 4 Zehen an jeder Pfote, die Handwurzel und das Sprunggelenk an allen vier Extremitäten beurteilt.

**Tabelle 1 Erstellung des klinischen Scores**

Score	Klinische Ausprägung
0	Keine klinischen Zeichen der Arthritis
1	Leichte Schwellung und Rötung
2	Starke Schwellung/Rötung bzw. Ulzerationen

Dabei war die Vergabe von 0,5 Punkte-Zwischenschritten möglich. Insgesamt war somit eine maximale Punktzahl von 48 Punkten möglich. Diese Versuche wurden durch die Regierung der Oberpfalz genehmigt (AZ: 54-2532.1-09/14).

### 2.1.3 Isolierung der Milz-B-Zellen

Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub> Narkose und anschließende zervicale Dislokation getötet. Dann wurden die Milzen entfernt und sofort in eiskalte *phosphat bufferd saline* Lösung (PBS) gegeben.

Zur Isolation der Milz-B-Zellen wurde zunächst eine Einzelzellsuspension mit Hilfe eines 70µm Zellsiebs hergestellt. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde die Zellsuspension 15 Minuten bei Raumtemperatur in 5ml Erythrozytenlysepuffer gegeben. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 45ml PBS beendet und die noch vorhandenen Zellen durch Zentrifugation mit 1400 Umdrehungen bei 4°C 8 Minuten gesammelt.

Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 10ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Anzahl der verbliebenen Milzzellen wurde mit einer Eppendorf-Zählkammer bestimmt.

Durch erneutes Zentrifugieren mit 1400 Umdrehungen bei 4°C für 8 Minuten wurden die Milzzellen gesammelt

und entsprechend der Zellzahl in MACS-Puffer resuspendiert.

Die eigentliche Isolation der B- Zellen wurde mit dem Pan-B-Cell Isolation Kit (*Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland*) durchgeführt. Dabei werden im ersten Schritt die Milzzellen mit biotinylierten Antikörpern (siehe unten) inkubiert.

- Anti CD4 zur Markierung von T-Zellen
- Anti CD11c zur Markierung myeloider Zellen
- Anti CD49b zur Markierung von Monozyten, Thrombozyten, Megakaryozyten
- AntiCD90.2 zur Markierung von T-Zellen
- Anti Terr-119 zur Markierung von Zellen der erythropoetischen Linie

Die einzigen Zellen, die nicht durch das Antikörpermisch markiert werden, sind die in der Milz

enthaltenen B-Zellen. Im zweiten Schritt werden Antibiotin-Antikörper, an die magnetische Partikel gekoppelt sind, zugegeben. Nachfolgend wird dieses Gemisch in eine magnetische Säule gegeben. Alle markierten Zellen werden durch die magnetischen Partikel in der Säule festgehalten, einzig die unmarkierten B-Zellen sammeln sich im Überstand. Die Reinheit der Zellen wurde exemplarisch mittels FACS überprüft und lag bei ca. 95 %.

Die isolierten B-Zellen wurden anschließend, wie oben beschrieben, mit einer Eppendorf-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden nun in jeweils zwei Fraktionen aufgeteilt:

- ein Teil für die Stimationsversuche
- ein Teil für die FACS-Färbungen.

## 2.2 Aufbau des Stimationsversuchs

Für die Stimationsversuche wurden von jeder Maus 6 Tubes mit je  $1 \times 10^6$  Zellen befüllt und in 99,5 % PBS /0,5

% FCS Medium (Hungermedium) über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach maximal 12 Stunden wurden die Zellen bei 2000 Umdrehungen bei 8°C, 8 Minuten zentrifugiert und in 1ml PBS resuspendiert.

Drei Ansätze mit jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $10^{-6}$  M Terbutalin stimuliert und für 30 Minuten bei 36 °C, 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die jeweilige Kontrolle wurde bis auf die Stimulation gleich behandelt.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die gesamte Reaktion auf Eis gestoppt und die Zellen durch Zugabe von 70µl 37 % Formaldehydlösung fixiert. (siehe unten)

Nach der Fixierung wurden die Zellen entsprechend den Färbeprotokollen für die FACS-Färbungen (siehe unten) behandelt.

## 2.3 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen nach Größe und intrazellulärer Granularität zu untersuchen.

Dabei fließen die Zellen einzeln in einem linearen Strom an einem Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, vorbei. Wird nun eine Zelle von dem Laserstrahl getroffen, wird das Licht hinter der Zelle gestreut. Diese Streuung wird von zellulären Faktoren wie Größe und Granularität beeinflusst und von zwei Detektoren registriert. Die Strahlen, die vorne abgelenkt werden (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter, FS) und in einem flachen Winkel detektiert werden, erlauben Rückschlüsse auf die Größe der Zellen. Vereinfachend dargestellt gilt, je mehr Streuung, desto größer die Zelle. Die Strahlen, die senkrecht zum Laser abgelenkt werden (Seitwärtsstreulicht, *side scatter*, SS), lassen Aussagen über die Granularität zu. Außerdem können zelluläre Strukturen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern markiert wurden, analysiert werden.

Durch das Licht des Lasers angeregt, werden Elektronen des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau gehoben. Fallen die Elektronen auf ihr Ausgangsenergieniveau zurück, wird Energie in Form

von Licht frei. Die Wellenlänge des emittierten Lichts hängt von der molekularen Struktur des Fluorochroms ab. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Coulter Epics XL Durchflusszytometer von Beckman Coulter (*Krefeld, Deutschland*) verwendet.

Die verwendeten Antikörper waren entweder mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Exzitation 488 nm, Emission 518 nm) oder mit Phycoerythrin (PE, Exzitation 488 nm, Emission 575 nm) markiert. Die Einstellung des FACS-Geräts sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2 Einstellungen des FACS- Geräts**

Detektor	Volt	Gain
FS	55	5
SS	400	20
FITC	682	1
PE	625	1



**Tabelle 3 Kompensationseinstellungen**

	FITC	PE
FI	XXXXXXXXXXXXXXXX	15
TC	XXXXXXX	
PE	19,8	XXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX

Die Auswertung erfolgte mit Win MDI (*Version 2.8, Verity, Topsham, ME, USA*) und Expo32 (*Version 1.2., Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland*) sowie FlowJo (*Version V10 Tree Star Inc. San. Carlos, CA, USA*)

## 2.4 FACS-Färbungen

### 2.4.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Die Zellen für die FACS-Färbungen wurden in 3 % Formaldehydlösung zehn Minuten bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> fixiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren bei 1400 Umdrehungen bei 4 °C, 8 Minuten gesammelt, die überstehende Flüssigkeit wurde abgossen und die Zellen mit FACS Puffer (siehe

oben) auf  $10 \times 10^6/\text{ml}$  verdünnt. Diese Suspension wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlschrank gelagert.

Nach 24h im Kühlschrank wurden die Zellen vor der eigentlichen Inkubation mit den Antikörpern für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Maus IgG (Abcam ab37355) zur Blockade der  $\text{Fc}$  Rezeptoren inkubiert. Dabei wurden  $10\mu\text{g}$  Maus IgG für  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

Anschließend wurden  $100\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^6$  Zellen) für die extrazelluläre Färbung des  $\beta_2$ -Adrenorezeptor entnommen.

Die verbleibende Suspension wurde erneut zentrifugiert (1400 Umdrehungen,  $4^\circ\text{C}$ , 8 Minuten), die überstehende Flüssigkeit entfernt und die Zellen mit CytoPerm (*BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA*) gemäß den Herstellerangaben für die intrazellulären Färbungen permeabilisiert.

### 2.4.2 Färbungen

Für das Projekt wurden für verschiedene Antigene Antikörperfärbungen etabliert.

Für jeden verwendeten spezifischen Antikörper wurde eine Kontrolle in Form einer Isotypkontrolle durchgeführt, die Isolation und Aufarbeitung der Zellen für Färbung und Kontrolle war identisch.

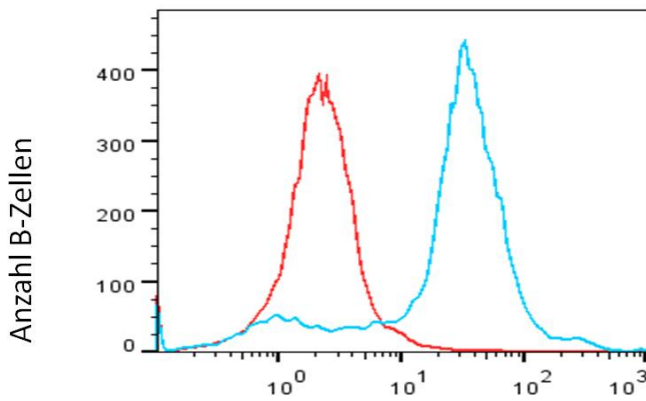
Dabei wurden die Zellen mit unspezifischem Rabbit IgG (Abcam ab172730, *Abcam, Cambridge, UK*) in der gleichen Massenkonzentration wie bei der spezifischen Färbung inkubiert. Die anschließende Weiterbehandlung und FACS-Analyse war für Färbung und Kontrolle ebenfalls identisch.

Im Folgenden sollen nun die einzelnen Färbeprotokolle als Ergebnisse der Etablierungsversuche dargestellt werden.

#### **β<sub>2</sub>-Adrenorezeptor**

Verwendeter Antikörper: Abcam ab36956; polyklonaler Antikörper (Rabbit IgG) gegen extrazelluläre Epitope des Beta<sub>2</sub>

	Adrenorezeptors; eingesetzte Konzentration $2\mu\text{g}/1 \times 10^6$ Zellen
Medium:	100 $\mu\text{l}$ FACS Puffer
Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1 ml FACS Puffer
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Sekundärantikörper:	Sigma Goat anti rabbit IgG (Produktnummer P9537, <i>Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA</i> ) konjugiert mit PE. Verdünnung 1/100, eingesetzte Konzentration $0,6\mu\text{g}/1 \times 10^6$ Zellen
Medium:	100 $\mu\text{l}$ FACS Puffer
Inkubationszeit:	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml FACS Puffer
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Aufnahme in 400 $\mu\text{l}$ PBS zur FACS Analyse	



Beta<sub>2</sub>-Adrenorezeptor PE MFI

### Abbildung 3 Ergebnis der Etablierungsversuche für den $\beta_2$ -AR

rot: Isotypkontrolle; blau  $\beta_2$ -Adrenorezeptor, Maus Milz-B-Zellen CIA Tag 37 FACS Analyse mit (Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10)

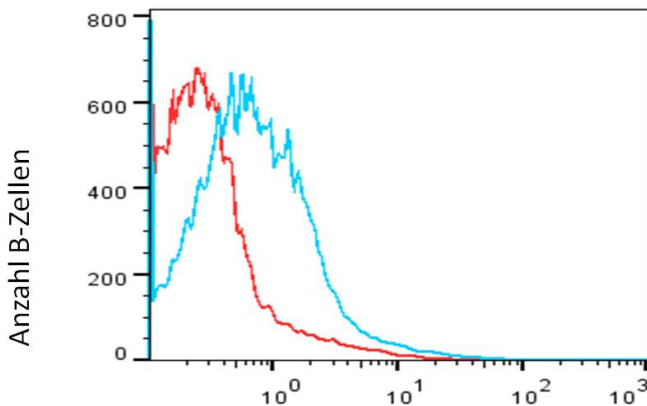
### $\alpha_1$ -Adrenorezeptor

Verwendeter Antikörper: Abcam ab3462, polyklonaler Antikörper (Rabbit IgG) gegen intrazelluläre Epitope des Alpha<sub>1</sub>Adrenorezeptors.  
eingesetzte Konzentration  
1,00 $\mu$ g/1x10<sup>6</sup>Zellen

Medium:	100µl CytoPerm
Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Sekundärantikörper:	Dako Goat anti Rabbit IgG biotinyliert (E0432, <i>Dako Denmark, Glostrup, Dänemark</i> ) Verdünnung 1/200, eingesetzte Konzentration 0,55µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	Streptavidin PE, eBioscience (12-4317-87, <i>eBioscience, Frankfurt, Deutschland</i> ) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm  
Inkubation: 30 Minuten bei Raumtemperatur  
Waschmedium: 1ml CytoPerm  
Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8 Minuten,  
8°C

Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse



Alpha 1 Adrenorezeptor PE MFI

#### **Abbildung 4 Ergebnis der Etablierungsversuche für den $\alpha_1$ -AR**

rot: Isotypkontrolle; blau  $\alpha_1$ Adrenorezeptor, intrazelluläre Färbung Maus Milz-B-Zellen CIA Tag 3 FACS Analyse mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

## **β-Arrestin 2**

Verwendeter Antikörper: Cell Signaling (Cat Nr. 3857,  
*Cell Signaling Technology, Cambridge, UK*)

monoklonaler Antikörper (Rabbit IgG) gegen β-Arrestin  
2 eingesetzte Konzentration: 23,5ng/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 1 Stunde bei

Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm

Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8

Minuten, 8°C

Sekundärantikörper: Dako Goat anti Rabbit IgG  
biotinyliert (E0432)

Verdünnung 1/200,  
eingesetzte Konzentration  
0,55µg/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

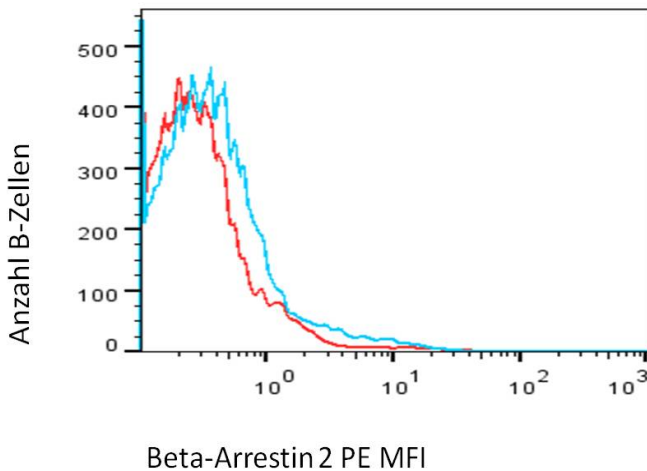
Inkubationszeit: 1 Stunde bei

Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm



Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von eBioscience (12-4317-87) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubation:	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse	



### **Abbildung 5 Ergebnis der Etablierungsversuche für $\beta$ -Arrestin 2**

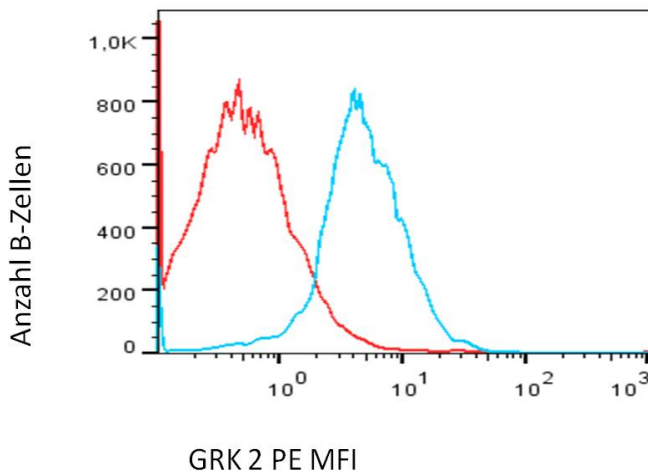
rot: Isotypkontrolle; blau Beta Arrestin 2, intrazelluläre Färbung, Maus Milz-B-Zellen CIA Tag 3 FACS Analyse mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

### **G-Proteinrezeptor Kinase 2**

Verwendeter Antikörper: Abcam ab32558,  
monoklonaler Antikörper  
(Rabbit IgG) gegen C-  
terminales Epitop der  
GRK2 eingesetzt

	Konzentration 330µg/1x10 <sup>6</sup>
	Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubationszeit:	1 Stunde bei
	Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8
	Minuten, 8°C
Sekundärantikörper:	Dako Goat anti Rabbit IgG
	biotinyliert (E0432)
	Verdünnung 1/200,
	eingesetzte Konzentration
	0,55µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubationszeit:	1 Stunde bei
	Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8
	Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von
	eBioscience (12-4317-87)

	eingesetzte Konzentration
	0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubation:	30 Minuten bei
	Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8
	Minuten, 8°C
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse	



**Abbildung 6 Ergebnis der Etablierungsversuche für die GRK2**

rot: Isotypkontrolle; blau GRK2, intrazelluläre Färbung,  
Maus Milz-B-Zellen CIA Tag 15 FACS Analyse mit  
Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit  
FlowJo V10

### **p38 Mitogen activated Kinase (p38 MAP Kinase)**

Verwendeter Antikörper: Cell signaling Nr. 8690,  
monoklonaler Antikörper (Rabbit IgG) gegen p38 MAP-  
Kinase

eingesetzte Konzentration: 0,095ng/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 1 Stunde bei  
Raumtemperatur

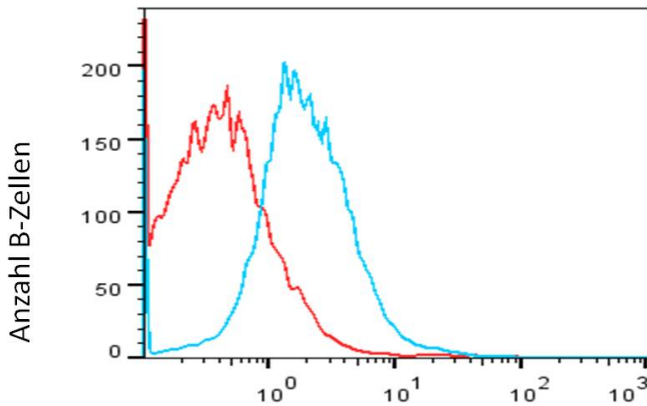
Waschmedium: 1ml CytoPerm

Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C

Sekundärantikörper: Dako Goat anti Rabbit IgG  
biotinyliert (E0432)  
Verdünnung 1/200,  
eingesetzte Konzentration  
0,55µg/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von eBioscience (12-4317-87) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubation:	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse	



P38 MAP Kinase PE MFI

### **Abbildung 7 Ergebnis der Etablierungsversuche für die p38 MAP Kinase**

rot: Isotypkontrolle; blau p38 MAP Kinase, intrazelluläre Färbung Maus Milz-B-Zellen CIA Tag 15 FACS Analyse mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

### **Phospho p38 MAP Kinase (pp38)**

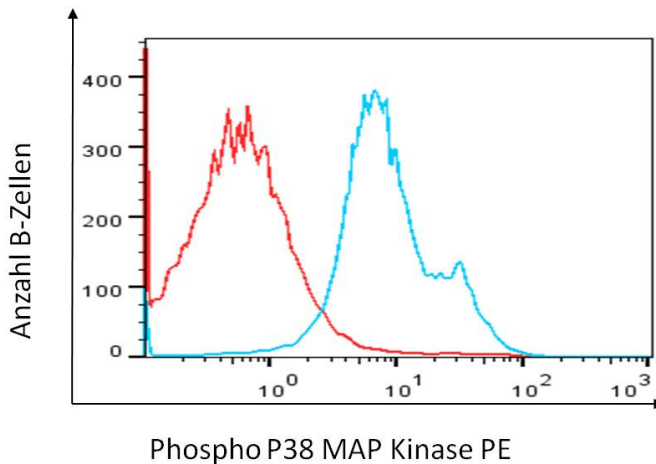
Verwendeter Antikörper: Cell Signaling Nr.4511 (Rabbit IgG) monoklonaler Antikörper gegen pp38,  
eingesetzte Konzentration: 0,195ng/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Sekundärantikörper:	Dako Goat anti Rabbit IgG biotinyliert (E0432) Verdünnung 1/200, eingesetzte Konzentration 0,55µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von eBioscience (12-4317-87) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm



Inkubation: 30 Minuten bei  
Raumtemperatur  
Waschmedium: 1ml CytoPerm  
Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C  
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse



**Abbildung 8 Ergebnis der Etablierungsversuche für die phospho p38 MAP Kinase**

rot: Isotypkontrolle; blau pp38 MAP Kinase, intrazelluläre Färbung Maus Milzzellen, FACS Analyse

mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

### **Extracellular regulated Kinase1/2 (ERK 1/2)**

Verwendeter Antikörper: Thermo Fisher scientific Nr.

MA5-15134 (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) monoklonaler Antikörper (Rabbit IgG) gegen ERK1/2

eingesetzte Konzentration 0,8ng/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 1 Stunde bei

Raumtemperatur

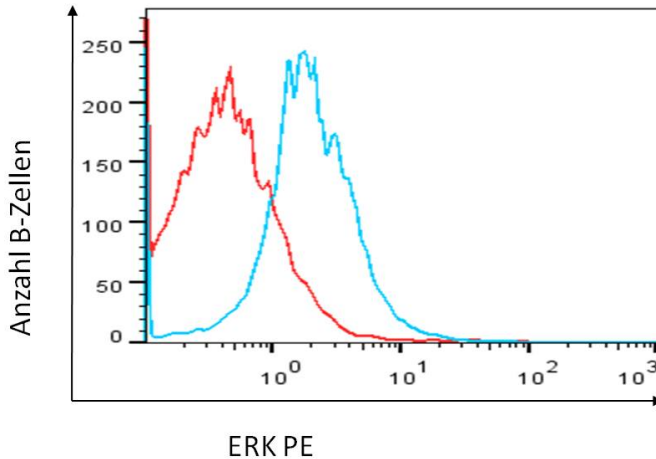
Waschmedium: 1ml CytoPerm

Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C

Sekundärantikörper: Dako Goat anti Rabbit IgG  
biotinyliert (E0432)  
Verdünnung 1/200,  
eingesetzte Konzentration  
0,55µg/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von eBioscience (12-4317-87) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubation:	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse	



### **Abbildung 9 Ergebnis der Etablierungsversuche für ERK 1/2**

rot: Isotypkontrolle; blau ERK1/2, intrazelluläre Färbung  
 Maus Milz-B-Zellen CIA Tag 15, FACS Analyse mit  
 Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit  
 FlowJo V10

### **Phospho ERK1/2 (pERK)**

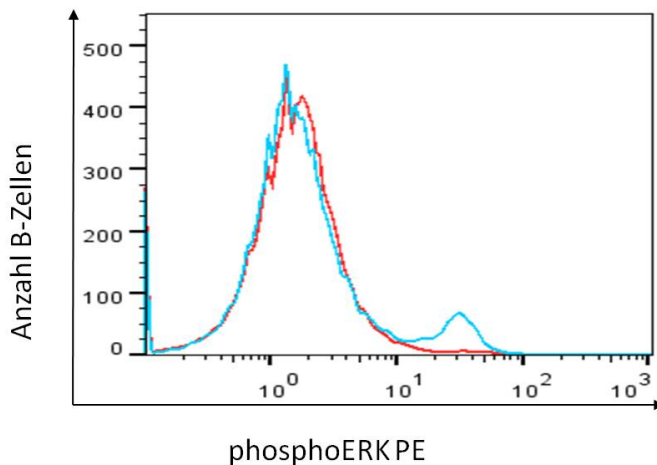
Verwendeter Antikörper: Cell Signaling Nr. 4370 (Rabbit  
 IgG) monoklonaler Antikörper gegen pERK

eingesetzte Konzentration:  $0,85\text{ng}/1 \times 10^6$  Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Sekundärantikörper:	Dako Goat anti Rabbit IgG biotinyliert (E0432) Verdünnung 1/200, eingesetzte Konzentration 0,55µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubationszeit:	1 Stunde bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von eBioscience (12-4317-87) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm

Inkubation: 30 Minuten bei  
Raumtemperatur  
Waschmedium: 1ml CytoPerm  
Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C  
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse



**Abbildung 10 Ergebnis der Etablierungsversuche für phosphoERK 1/2**

Ergebnis der Etablierungsversuche rot: Isotypkontrolle;  
blau pERK1/2, intrazelluläre Färbung

Maus Milzzellen, FACS Analyse mit Coulter Epics XL,  
Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

**cAMP responsive Element binding Protein (CREB)**

Verwendeter Antikörper: Abcam ab32515 (Rabbit IgG)  
monoklonaler Antikörper gegen CREB

eingesetzte Konzentration 0,152µg/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 1 Stunde bei  
Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm

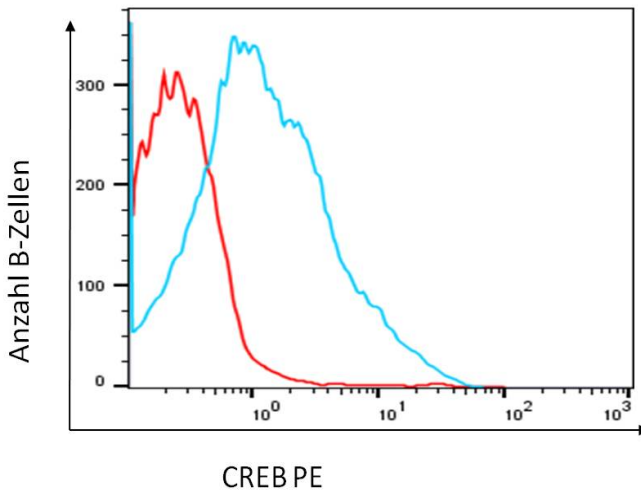
Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C

Sekundärantikörper: Sigma Goat anti rabbit IgG  
(Produktnummer P9537)  
konjugiert mit PE.  
Verdünnung 1/100,  
eingesetzte Konzentration  
0,6µg/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 30 Minuten bei  
Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm  
Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C  
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse



**Abbildung 11 Ergebnis der Etablierungsversuche für CREB**

Ergebnis der Etablierungsversuche rot: Isotypkontrolle; blau CREB, intrazelluläre Färbung Maus Milz B-Zellen, FACS Analyse mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10



## **Phospho cAMP-responsive Element binding Protein (pCREB)**

Verwendeter Antikörper: Abcam ab32096, monoklonaler Antikörper (Rabbit IgG) gegen an Serin 133 phosphoryliertes CREB

eingesetzte Konzentration 69,6ng/1x10<sup>6</sup>Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 1 Stunde bei  
Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm

Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C

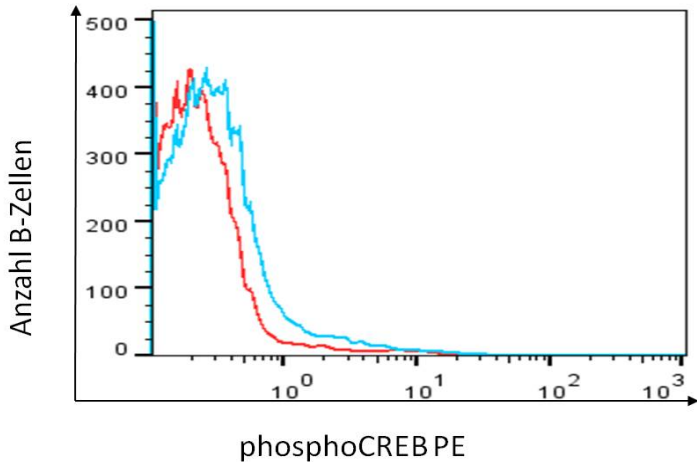
Sekundärantikörper: Dako Goat anti Rabbit IgG  
biotinyliert (E0432)  
Verdünnung 1/200,  
eingesetzte Konzentration  
0,55µg/1x10<sup>6</sup> Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

Inkubationszeit: 1 Stunde bei  
Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm

Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Färbung:	mit Streptavidin PE von eBioscience (12-4317-87) eingesetzte Konzentration 0,075µg/1x10 <sup>6</sup> Zellen
Medium:	100µl CytoPerm
Inkubation:	30 Minuten bei Raumtemperatur
Waschmedium:	1ml CytoPerm
Zentrifugation:	2000 Umdrehungen, 8 Minuten, 8°C
Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse	



## Abbildung 12 Ergebnis der Etablierungsversuche für phosphoCREB

Ergebnis der Etablierungsversuche rot: Isotypkontrolle; blau pCREB, intrazelluläre Färbung Maus Milz B-Zellen CIA Tag 3, FACS Analyse mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

## Intrazelluläres IL-10

Färbung

Verwendeter Antikörper: Anti-IL10 PE (Klon: JES5-16E3, eBioscience *eBioscience, Frankfurt, Deutschland*), eingesetztes Volumen  $5\mu\text{l}$  ( $0,125\mu\text{g}$ ) /  $1 \times 10^6$  Zellen

Medium: 100µl CytoPerm

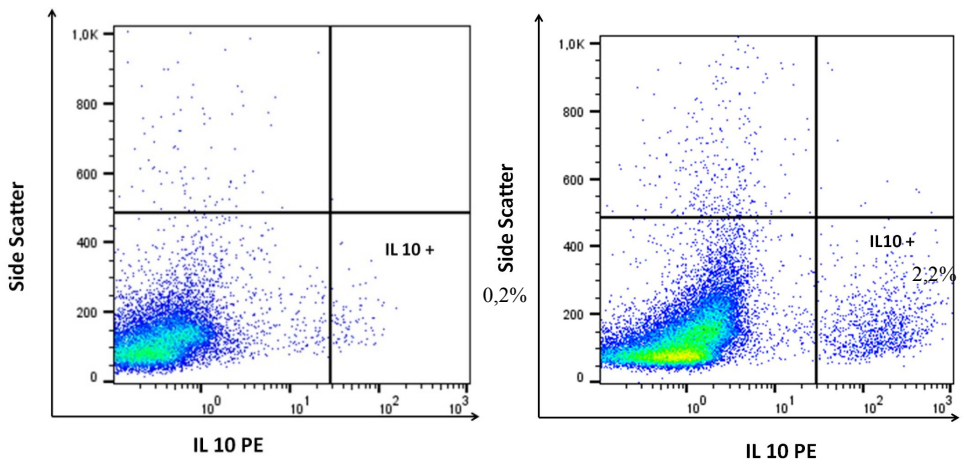
Inkubationszeit: 1 Stunde bei  
Raumtemperatur

Waschmedium: 1ml CytoPerm

Zentrifugation: 2000 Umdrehungen, 8  
Minuten, 8°C

Aufnahme in 400µl PBS zur FACS Analyse

### Gating-Strategie



**Abbildung 13 Ergebnis der Etablierungsversuche für IL-10**

Gating-Strategie zur Analyse von IL10. Links Isotyp, Rechts IL-10 PE Färbung; Maus Milz-B-Zellen, CIA Tag 48. FACS Analyse mit Coulter Epics XL, Auswertung und Darstellung mit FlowJo V10

## 2.5 Auswertung

Zum Test der Hypothesen wurden jeweils mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Die genaue Anzahl durchgeführter Wiederholungen ist den einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

Die Auswertung der FACS-Daten und Darstellung von Histogrammen wurde mit Flow-Jo (*Version V10 Tree Star Inc. San. Carlos, CA, USA*) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Analysen verwendet.

Das Ergebnis der Overtone-Analyse wurde als Korrelat dafür gewertet, wie viele der Messereignisse ( Zellen ) positiver als eine Kontrolle sind (hier: Isotyp-Kontrolle).

Die Mean-Analyse (MFI = Mean fluorescens intensity) wurde als Maß für die Menge Antigen pro Zelle gewertet.

Die ermittelten Daten wurden anschließend auf die Kontrollgruppe (nicht immunisierte, gesunde Tiere,

gleiches Alter, wie älteste immunisierte Gruppe) normalisiert.

Die statistische Auswertung wurde mit IBM SPSS Statistics (*Version 23, IBM Corporation, Armonk USA*) durchgeführt. Zum Vergleich von mehreren Gruppen erfolgte die Varianzanalyse mit post-hoc-Tests, p-Werte  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angenommen.

Die Grafiken wurden mit Sigma Plot (*Version 11, Systat Software Inc., Chicago, USA*) erstellt.

### 3. Ergebnisse

In Tierexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass das sympathische Nervensystem einen Einfluss auf die experimentell induzierte Arthritis hat. Der Einfluss des SNS hängt aber von der jeweiligen Phase der Entzündung ab [58].

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren auf Milz B-Zellen die IL-10 Produktion dieser B-Zellen steigert [132]. Dadurch sind diese Zellen in der Lage, die Progression der Arthritis zu hemmen und antientzündlich zu

wirken [132]. Allerdings kann die IL-10 Produktion durch  $\beta_2$ -AR Stimulus nur gesteigert werden, wenn B-Zellen aus immunisierten Tieren und nicht aus naiven Tieren verwendet werden [132].

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass im Verlauf der adjuvant-induzierten Arthritis bei Ratten die G-Proteinrezeptorkinase (GRK) im Verlauf der Entzündung herunter reguliert wird [71].

### 3.1 Adrenerge Rezeptoren auf Milz-B-Zellen im Verlauf der CIA

Zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA wurde die Expression des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors und  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors untersucht. Dabei wurde einerseits analysiert wie viele B-Zellen die Rezeptoren tragen, zum anderen wurde untersucht, ob sich die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle verändert.

Dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden: Die Anzahl der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor tragenden B-Zellen steigt im Verlauf der CIA an (Abbildung 14; absoluter Mittelwert Tag 0: 28,1%  $\pm$  6,9% (Standartabweichung); Tag 25: 51,05% $\pm$ 11,34%; Tag 55:

55,93%±7,72%), während sich die Rezeptordichte des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors nicht verändert (Abbildung 15; absoluter Mittelwert Tag 0: 1,83±1,17).

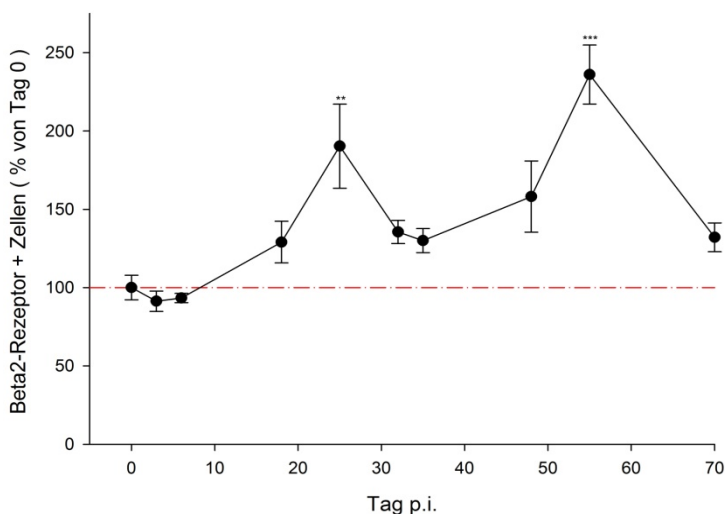
Hinsichtlich des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors zeigte sich, dass dieser Rezeptor auf einem Teil der B-Zellen vorhanden ist, sich dieser Anteil aber nicht signifikant ändert (Abbildung 16; absoluter Mittelwert Tag 0: 40,3%±22,8%). Die Rezeptordichte hingegen nimmt im späteren Verlauf der Entzündung zu (Abbildung 17; absoluter Mittelwert Tag 0: 8,5±6,4; Tag 55: 25,97±2,7).

Außerdem wurden Korrelationsanalysen zwischen dem  $\beta_2$ -AR und dem  $\alpha_1$ -AR durchgeführt. Dabei zeigte sich zwischen dem Expressionslevel des  $\beta_2$ -AR und dem Anteil der  $\alpha_1$ -AR positiven B-Zellen (Abbildung 18, Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,677;  $p < 0,01$ ), sowie zwischen Expressionslevel des  $\beta_2$ -AR und dem Expressionslevel des  $\alpha_1$ -AR (Abbildung 19, Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,732;  $p < 0,01$ ) jeweils ein signifikanter positiver Zusammenhang.

Zwischen dem Anteil  $\beta_2$ -AR positiver B-Zellen und dem Anteil  $\alpha_1$ -AR positiver B-Zellen (Abbildung 20, Korrelationskoeffizient nach Spearman: -0,07; nicht signifikant) sowie zwischen dem Anteil  $\beta_2$ -AR positiver B-Zellen und dem Expressionslevel des  $\alpha_1$ -



AR (Abbildung 21, Korrelationskoeffizient nach Spearman: 0,022; nicht signifikant) wurde keine signifikante Korrelation gefunden.

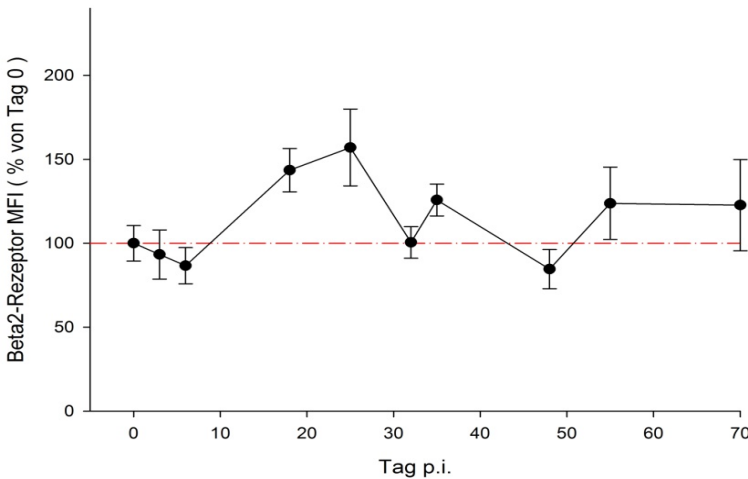


#### Abbildung 14 $\beta_2$ -Adrenorezeptor positive B-Zellen

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiver Zellen wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind in Prozent zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,25,32,35,48,70) = 6; n (Tag 3,6,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach

Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0: 28,1% ± Standartabweichung: 6,9%; Tag 25: 51,05%±11,34%; Tag 55: 55,93%±7,72%

\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001



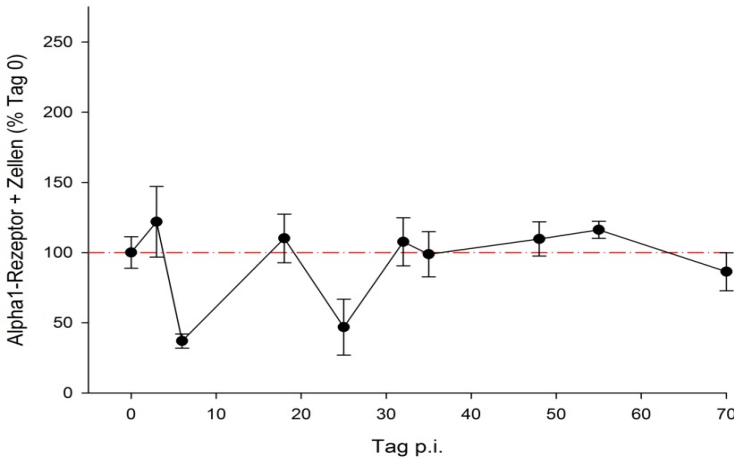
### Abbildung 15 $\beta_2$ -Adrenorezeptor MFI auf B-Zellen

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,25,32,35,48,70) = 6; n (Tag 3,6,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte

wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet.

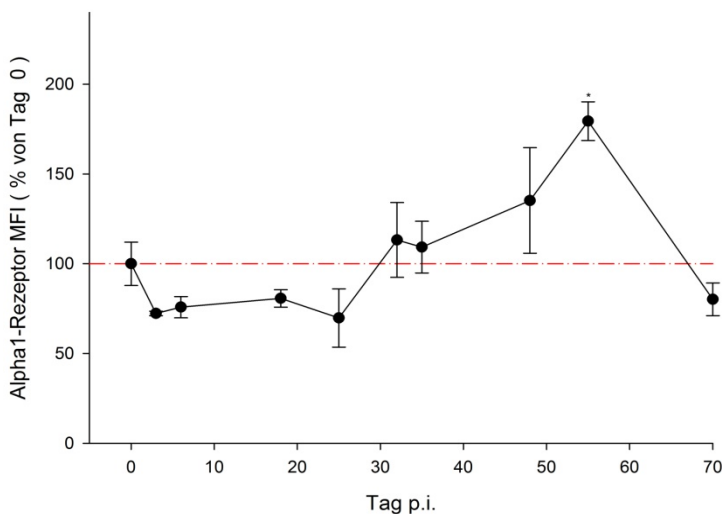
Absoluter Mittelwert Tag 0:  $1,83 \pm 1,17$

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Abbildung 16 $\alpha_1$ -Adrenorezeptor positive B-Zellen

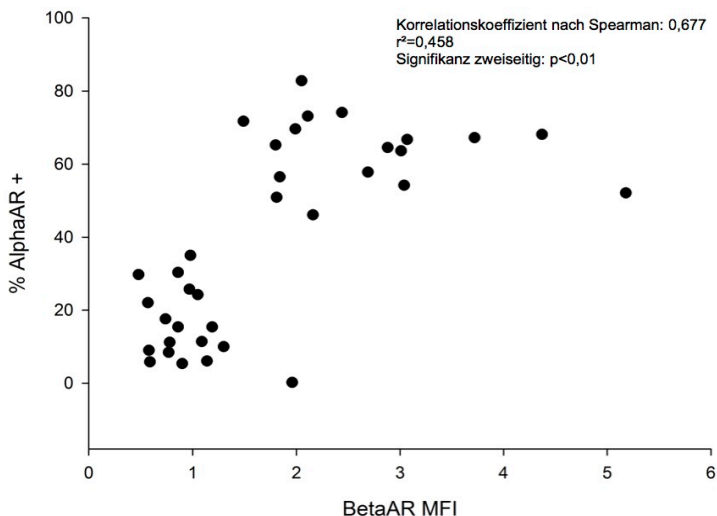
B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor positiver Zellen wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind in Prozent zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0, 18, 32, 35, 70) = 6; n (Tag 3, 6, 25, 48, 55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $40,3\% \pm 22,8\%$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Abbildung 17 $\alpha_1$ -Adrenorezeptor MFI

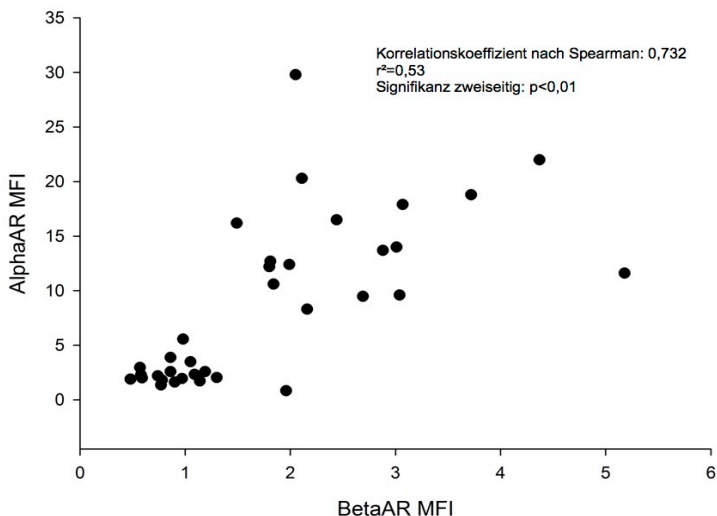
B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,32,35,70) = 6; n (Tag 3,6,25,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $8,5 \pm 6,4$ ; Tag 55:  $25,97 \pm 2,7$

\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.



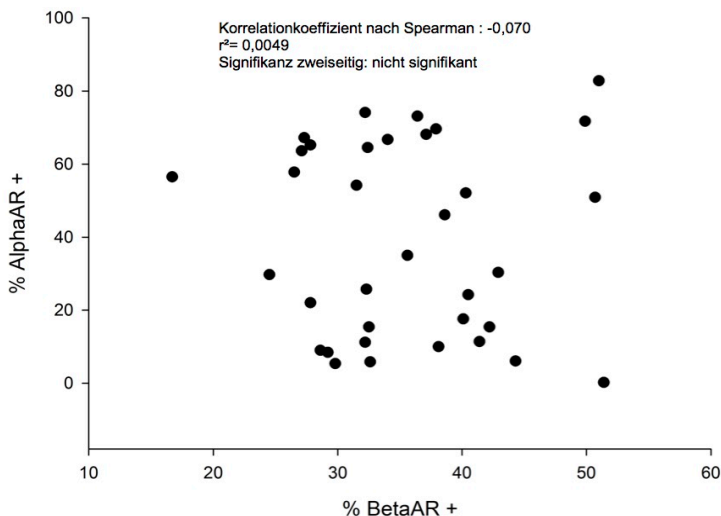
**Abbildung 18 Korrelation BetaAR MFI AlphaAR positive B-Zellen**

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil der Zellen, die den  $\alpha_1$ AR bzw. das Expressionslevel (MFI) des  $\beta_2$ AR tragen wurde mittels FACS ermittelt. Es wurde eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.



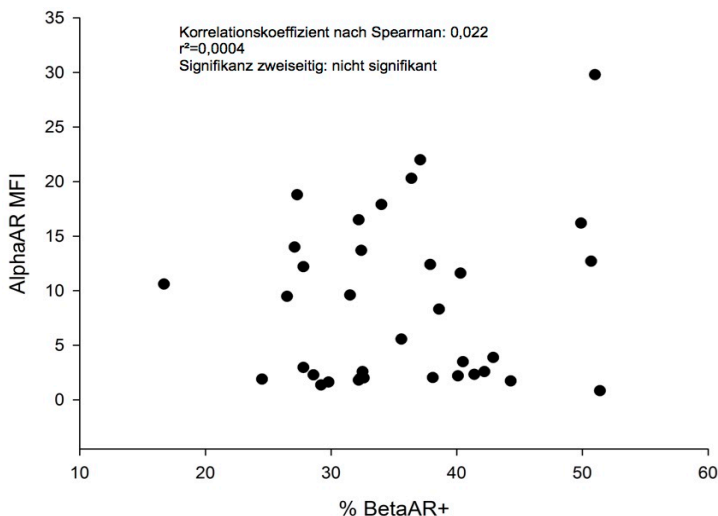
### Abbildung 19 Korrelation BetaAR MFI AlphaAR MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil der Zellen, die den  $\beta_2$ AR tragen bzw. das Expressionslevel (MFI) des  $\alpha_1$ AR wurde mittels FACS ermittelt. Es wurde eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.



### Abbildung 20 Korrelation BetaAR positive B-Zellen AlphaAR positive B-Zellen

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil der Zellen, die den  $\beta_2$ AR bzw. den  $\alpha_1$ AR tragen wurde mittels FACS ermittelt. Es wurde eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.



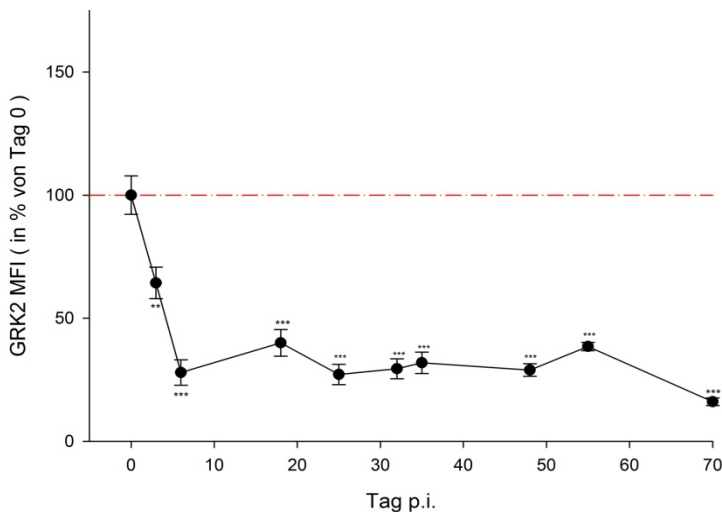
## Abbildung 21 Korrelation BetaAR positive B-Zellen AlphaAR MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil der Zellen, die den  $\beta_2$ AR tragen bzw. das Expressionslevel (MFI) des  $\alpha_1$ AR tragen wurde mittels FACS ermittelt. Es wurde eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.



### 3.2 Regulation des $\beta_2$ -Adrenorezeptors

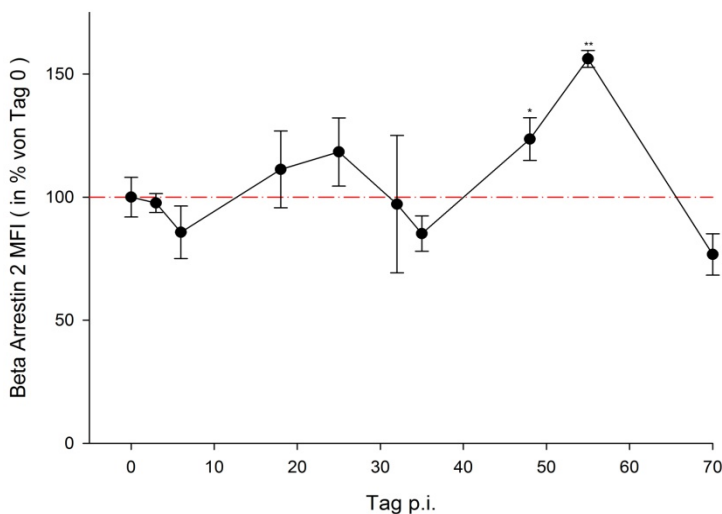
Wie bereits in der Literatur für das Rattenmodell beschrieben, kann eine Veränderung der GRK Expression im Verlauf der Arthritis beobachtet werden [71]. Da eine Veränderung der Rezeptorregulation eine Auswirkung auf die nachgeschalteten Signalwege hat, wurden im Rahmen des Projekts zwei der prominentesten Regulatoren des  $\beta_2$ -Adrenorezeptor, die G-Proteinrezeptorkinase 2 und  $\beta$ -Arrestin 2 im Verlauf der Entzündung beobachtet. Wie im Rattenmodell zeigte sich eine deutliche Abnahme der GRK2 bereits kurz nach Induktion der Arthritis (Abbildung 22; absoluter Mittelwert Tag 0:  $28,4 \pm 22,2$ ; Tag 3:  $4,08 \pm 0,7$ ; Tag 6:  $1,58 \pm 0,61$ ; Tag 18:  $5,76 \pm 5,7$ ; Tag 25:  $1,72 \pm 0,45$ ; Tag 70:  $4,96 \pm 4,23$ ), die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums anhält. Bei der Analyse von  $\beta$ -Arrestin 2 zeigte sich, dass sich die Expression dieses Proteins in der ersten Phase der Erkrankung nicht verändert. Im weiteren Verlauf ab Tag 35 p.i. zeigt sich dann ein Anstieg von  $\beta$ -Arrestin 2 in den Zellen (Abbildung 23; absoluter Mittelwert Tag 0:  $4,35 \pm 3,2$ ; Tag 48:  $9,02 \pm 1,09$ ; Tag 55:  $11,1 \pm 0,43$ ).



## Abbildung 22 GRK2 MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) der GRK 2 wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,32,35,70) = 6; n (Tag 3,6,25,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $28,4 \pm 22,2$ ; Tag 3:  $4,08 \pm 0,7$ ; Tag 6:  $1,58 \pm 0,61$ ; Tag 18:  $5,76 \pm 5,7$ ; Tag 25:  $1,72 \pm 0,45$ ; Tag 70:  $4,96 \pm 4,23$

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Abbildung 23 $\beta$ -Arrestin 2 MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von  $\beta$ -Arrestin 2 wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,25,32,35,70) = 6; n(Tag 3,6,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $4,35 \pm 3,2$ ; Tag 48:  $9,02 \pm 1,09$ ; Tag 55:  $11,1 \pm 0,43$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

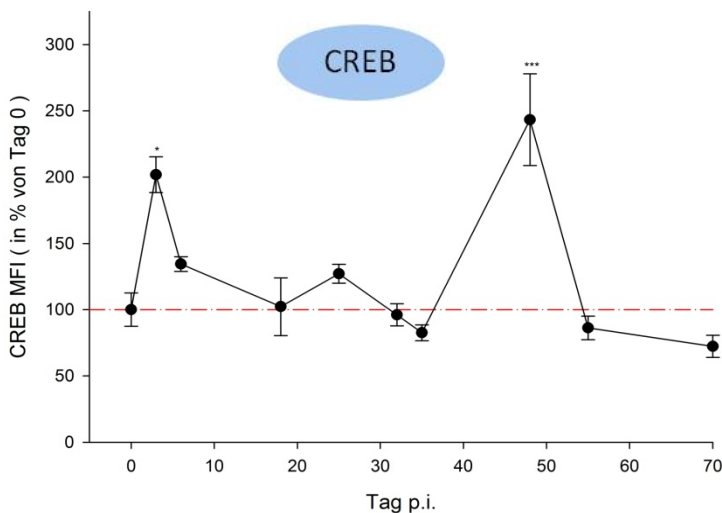
### 3.3 Intrazelluläre Signalwege

Um zu beobachten, ob sich die verschiedenen, dem  $\beta_2$ -Adrenorezeptor nachgeschalteten Signalwege im Verlauf der Arthritis verändern, wurden die intrazellulären Spiegel von CREB (Abbildung 24; absoluter Mittelwert Tag 0:  $2,31 \pm 0,84$ ; Tag 48:  $6 \pm 3,1$ ), p38 MAP-Kinase (Abbildung 28; absoluter Mittelwert Tag 0:  $3,61 \pm 2,5$ ) und ERK1/2 (Abbildung 26, absoluter Mittelwert Tag 0:  $6,5 \pm 0,16$ ; Tag 55:  $11,48 \pm 2,35$ ) jeweils in unphosphoryliertem und in phosphoryliertem Zustand ohne vorherige Stimulation (pCREB Abbildung 25; absoluter Mittelwert Tag 0:  $3,51 \pm 1,1$ ; Tag 48:  $\pm 0,7$ ; Tag 55:  $\pm 1,4$ ; pp38 Abbildung 29; absoluter Mittelwert Tag 0:  $3,34 \pm 1,38$ ; Tag :  $1,94 \pm 0,5$ ; Tag 6:  $\pm 0,11$ ; pERK Abbildung 27; absoluter Mittelwert Tag 0:  $2,54 \pm 1,17$ ; Tag 32:  $\pm 0,25$ ) analysiert.

Da die Dichte sympathischer Nervenendigungen in den sekundären lymphatischen Organen abnimmt [148,151], wurde erwartet, dass die intrazellulären Spiegel der phosphorylierten second-messenger in der ersten Phase der Entzündung abnehmen. Diese Annahme bestätigte sich bei pp38 und pERK (Abbildungen 23 und 25). Außerdem konnte gezeigt werden, dass im späteren

Krankheitsverlauf die phosphorylierten Formen ansteigen. Diese Beobachtung zeigte sich vor allem bei pCREB (Abbildung 21).

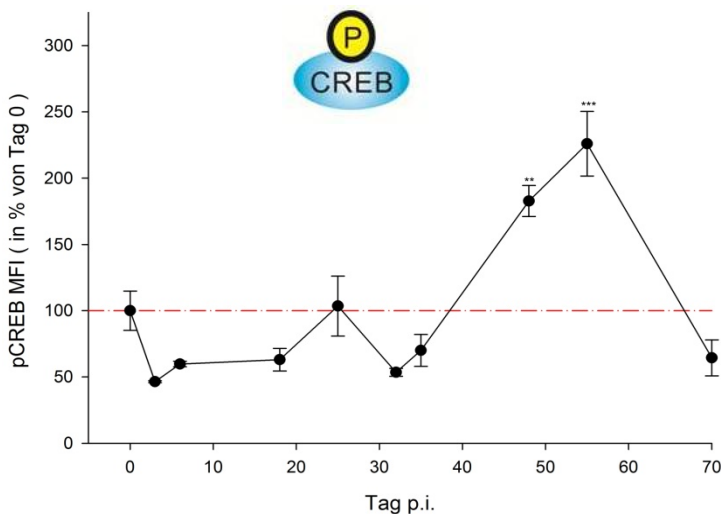
Insgesamt führte diese Beobachtung zu der Hypothese, dass der Abfall der phosphorylierten Formen auf den Rückgang der sympathischen Nervenfasern zurückzuführen ist. Der Anstieg im späteren Verlauf der Entzündung könnte auf Tyrosin-Hydroxylase positive Zellen (TH<sup>+</sup> Zellen) zurückzuführen sein, die in der chronischen Phase der Entzündung nachweisbar werden und Katecholamine zur Stimulation der adrenergen Rezeptoren zur Verfügung stellen. (siehe Diskussion) [148].



**Abbildung 24 CREB MFI**

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von CREB wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n(Tag 0,18,32,35,48,70) = 6; n(Tag 3,6,25,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $2,31 \pm 0,84$ ; Tag 48:  $6 \pm 3,1$

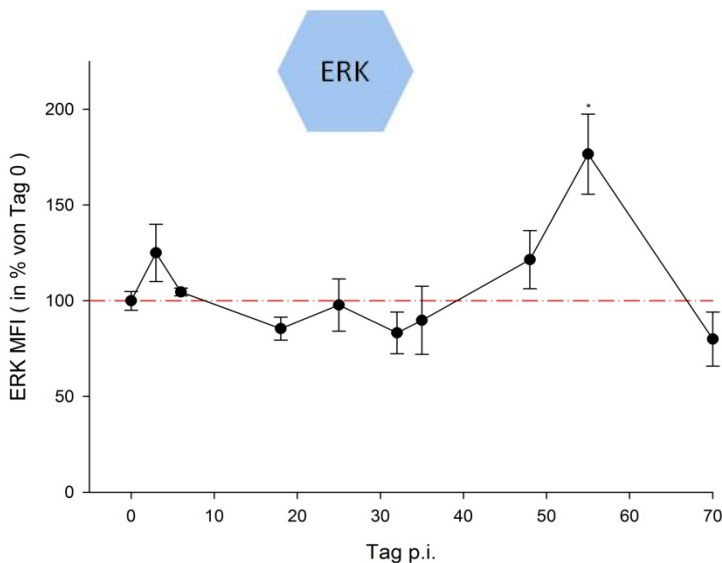
\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



## Abbildung 25 pCREB MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post

Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von Phospho-CREB wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n(Tag 0,18,32,35,70) = 6; n(Tag 3,6,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $3,51 \pm 1,1$ ; Tag 48:  $\pm 0,7$ ; Tag 55:  $\pm 1,4$   
\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

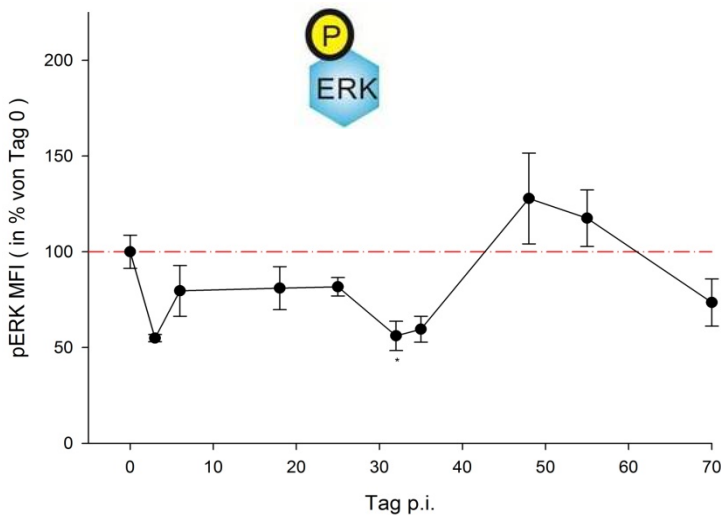


### Abbildung 26 ERK 1/2 MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von ERK1/2 wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n(Tag 0,18,32,35,70) = 6; n(Tag 3,6,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $6,5 \pm 0,16$ ; Tag 55:  $11,48 \pm 2,35$

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

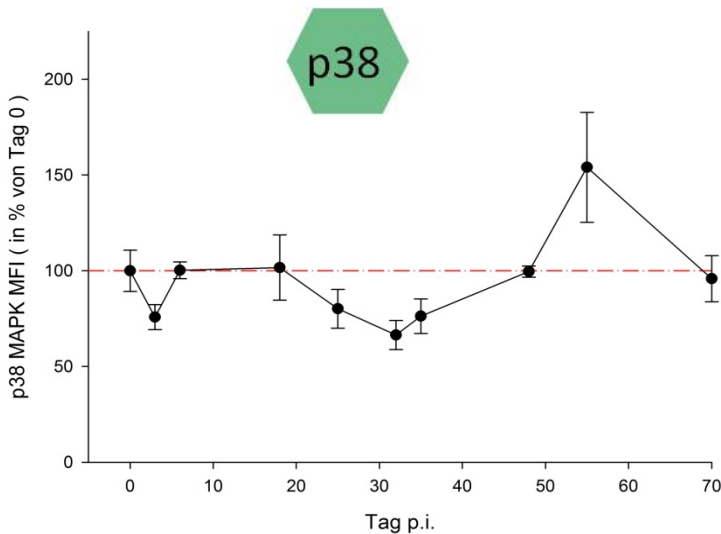




### Abbildung 27 pERK MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von Phospho-ERK1/2 wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt.  $n(\text{Tag } 0, 18, 32, 35, 70) = 6$ ;  $n(\text{Tag } 3, 6, 48, 55) = 3$ . Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $2,54 \pm 1,17$ ; Tag 32:  $\pm 0,25$ .

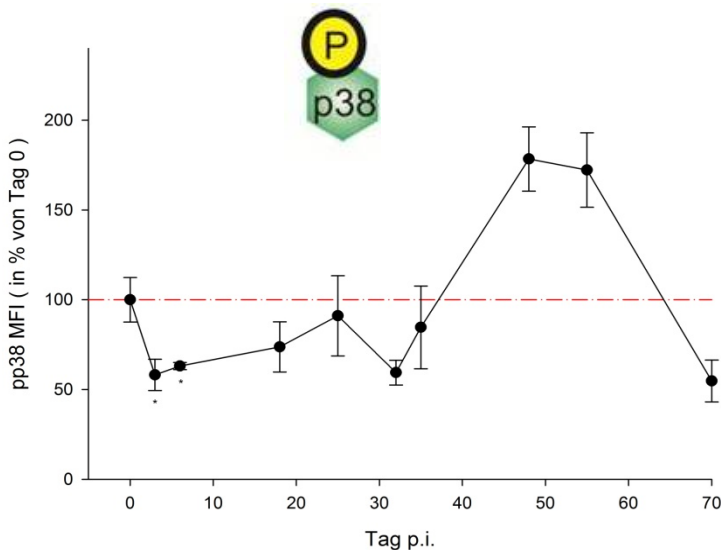
\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Abbildung 28 p38 MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i.= post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von p38 MAP Kinase wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,32,35,70) = 6; n (Tag 3,6,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $3,61 \pm 2,5$ .

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



### Abbildung 29 pp38 MFI

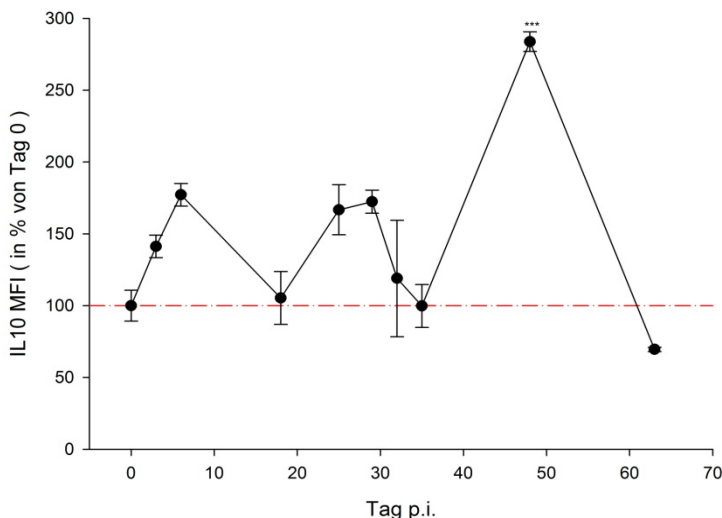
B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von Phospho-p38 MAP Kinase wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt.  $n$  (Tag 0,18,32,35,70) = 6;  $n$  (Tag 3,6,48,55) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet. Absoluter Mittelwert Tag 0:  $3,34 \pm 1,38$ ; Tag 3:  $1,94 \pm 0,5$ ; Tag 6:  $\pm 0,11$

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### 3.4 Intrazelluläres Interleukin 10

Neben den *second-messengern* wurde mit der oben beschriebenen Methode das intrazelluläre IL-10 (Abbildung 30; absoluter Mittelwert Tag 0:  $62,95 \pm 16,45$ ; Tag 48:  $178,67 \pm 7,4$ ) in B-Zellen im Verlauf der Arthritis beobachtet. Dabei zeigte sich, dass es im Verlauf der Arthritis zu Schwankungen im intrazellulären Gehalt von IL-10 kommt. IL-10 steigt in der Spätphase [148] der Erkrankung. Jedoch besteht keine eindeutige Korrelation mit der Dauer oder der Schwere der Erkrankung (siehe Partielle Korrelationen). Auch der Anteil der Zellen, die IL-10 enthalten verändert sich im Verlauf der CIA (Abbildung 31; absoluter Mittelwert Tag 0:  $0,21\% \pm 0,21\%$ ; Tag 25:  $1,03\% \pm 0,17\%$ ; Tag 48:  $2,15\% \pm 0,44\%$ ). Hier kommt es zu einem Anstieg in der frühen Phase [148] der Erkrankung und einem weiteren Anstieg in der Spätphase [148] der Erkrankung. Außerdem wurden Korrelationsanalysen durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen IL-10 und dem  $\beta_2$ -AR zu untersuchen. Hier zeigt sich im Hinblick auf das Expressionslevel ein negativer statistischer

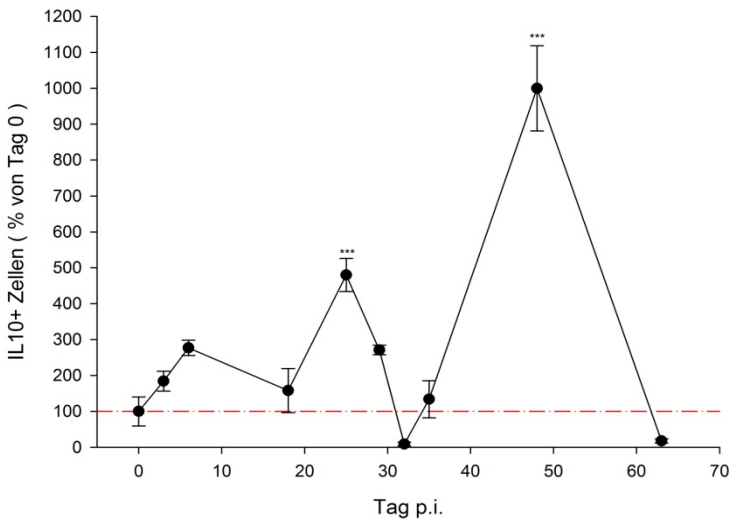
Zusammenhang (Abbildung 32). Bei der Korrelationsanalyse der Anteile positiver Zellen zeigt sich hingegen ein positiver Zusammenhang (Abbildung 33).



### Abbildung 30 IL-10 MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI = Mean fluorescence intensity) von Interleukin 10 (IL-10) wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt. n (Tag 0,18,35) = 6; n (Tag 3,6,25,29,32,48,63) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet.

Absoluter Mittelwert Tag 0:  $62,95 \pm 16,45$ ; Tag 48:  $178,67 \pm 7,4$ .  
 \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



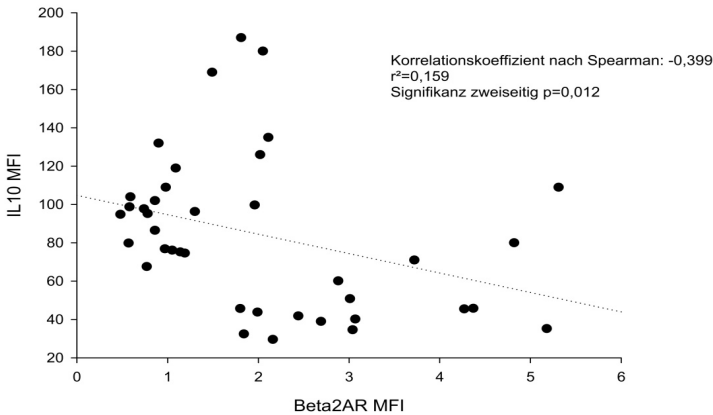
### Abbildung 31 IL10 positive B-Zellen

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil der Zellen, die IL-10 enthalten wurde mittels FACS ermittelt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Mittelwert der Tag 0 Werte (rote Referenzlinie) dargestellt.  $n(\text{Tag } 0, 18, 35) = 6$ ;  $n(\text{Tag } 48, 63) = 5$

3,6,25,29,32,48,63) = 3. Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Test nach Bonferroni verwendet.

Absoluter Mittelwert Tag 0: 0,21%±0,21%; Tag 25: 1,03%±0,17%; Tag 48: 2,15%±0,44%

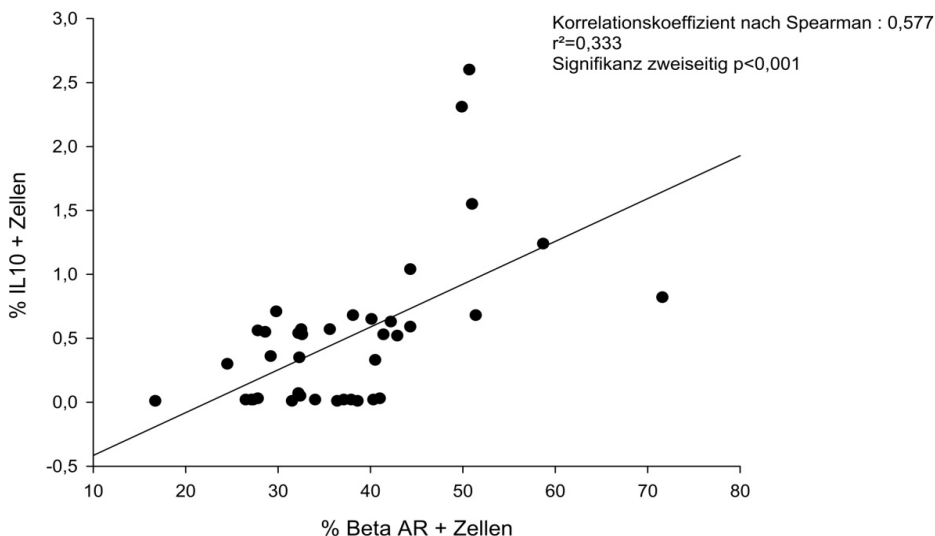
\*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001



### Abbildung 32 Korrelation $\beta_2$ -AR MFI IL-10 MFI

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Das Expressionslevel (MFI) von IL-10 bzw. des  $\beta_2$ AR wurde mittels FACS ermittelt. Es wurde eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Insgesamt ergibt sich zwischen dem  $\beta_2$ -AR MFI und dem IL-10 MFI ein negativer mathematischer Zusammenhang. Die Abbildung weist jedoch auf zwei unterschiedliche Populationen hin. Zum einen eine Gruppe, die  $\beta_2$ -AR niedrig exprimiert und qualitativ einen starken positiven Zusammenhang mit IL-10 hat und zum anderen eine Gruppe, die  $\beta_2$ -AR weniger stark exprimiert und einen weniger starken, jedoch positiven Zusammenhang mit IL-10 zeigt.



**Abbildung 33 Korrelation  $\beta_2$ -AR positive B-Zellen IL-10 positive B-Zellen**



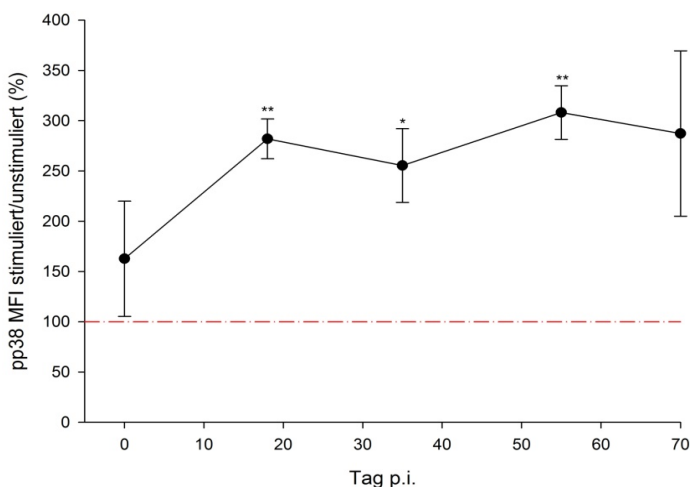
B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Der Anteil der Zellen, die IL-10 enthalten bzw. den  $\beta_2$ AR tragen wurde mittels FACS ermittelt. Es wurde eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt

### 3.5 *second-messenger* nach Stimulation

In einem weiteren Versuchsteil wurde untersucht, ob sich im Verlauf der CIA das Ansprechen der B-Zellen auf einen definierten  $\beta_2$ -Adrenorezeptor Stimulus verändert. Hintergrund dieses Experiments war die Frage, ob die in Abbildung 22 und 23 dargestellte Veränderung der Rezeptorregulation auch zu einem veränderten Ansprechen auf einen  $\beta_2$ -Stimulus führt.

Dabei wurden die Zellen für 30 Minuten mit  $10^{-6}$ M Terbutalin stimuliert und anschließend die phosphorylierten Formen der p38, CREB und ERK1/2 mittels FACS gemessen (siehe Aufbau Stimulationsversuch). Die Ergebnisse der stimulierten Formen wurden mit den nicht stimulierten Kontrollen ins Verhältnis gesetzt (Abbildungen 34, 35, 36). Es zeigte sich, dass der p38 Signalweg in den erkrankten Tieren an allen beobachteten Zeitpunkten signifikant auf den  $\beta_2$ -Stimulus reagiert (Abbildung

34). Bei pCREB (Abbildung 35) und pERK (Abbildung 36) führt der  $\beta_2$ -Stimulus in der frühen Phase der Arthritis zu keiner signifikanten Steigerung im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Diese beiden Signalwege zeigen erst ab Tag 35 eine Steigerung im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Abbildungen 35, 36).

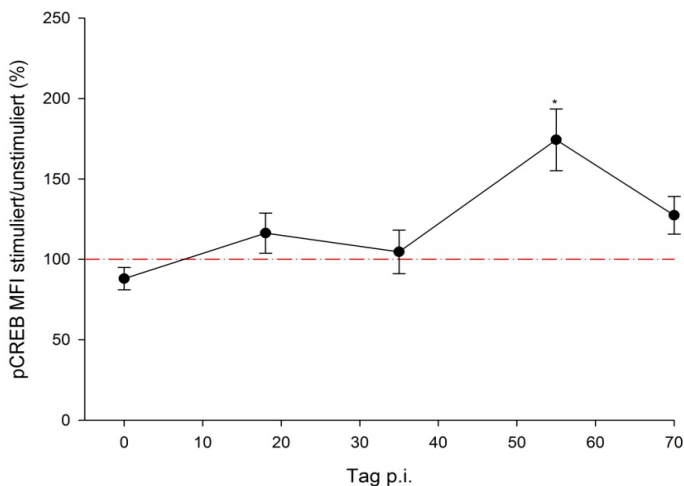


#### **Abbildung 34 pp38 MFI nach Stimulation**

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Die Zellen wurden über Nacht in PBS+0,5%FCS bei 4°C gelagert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden entweder mit oder ohne  $10^{-6}$  M Terbutalin 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gewaschen und

permeabilisiert. Die intrazellulären Spiegel von phosphoryliertem p38 (pp38) wurden mittels FACS bestimmt. Die Ergebnisse sind als prozentuale Veränderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (rote gestrichelte Linie) dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Tests nach Bonferroni verwendet. n=3 pro Zeitpunkt.

Absoluter Mittelwert von pp38 nach Stimulation an Tag 0:  $1,31 \pm 0,55$ ; Tag 18:  $2,3 \pm 0,24$ ; Tag 35:  $2,97 \pm 0,55$ ; Tag 55:  $5,65 \pm 1,29$ . \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001



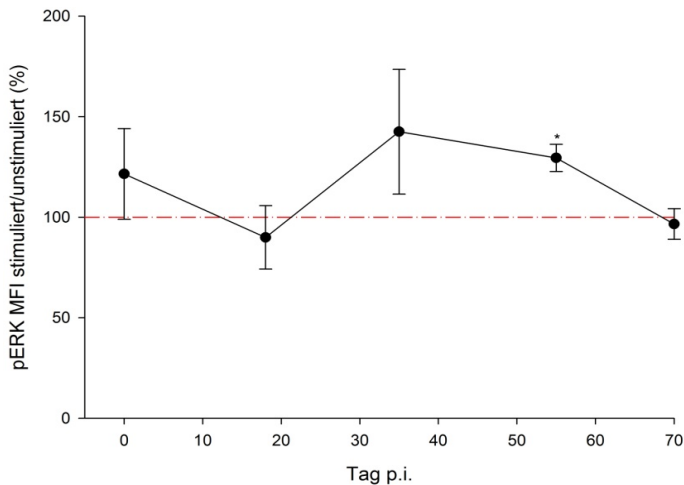
### Abbildung 35 pCREB MFI nach Stimulation

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post

Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Die Zellen wurden über Nacht in PBS+0,5%FCS bei 4°C gelagert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden entweder mit oder ohne  $10^{-6}$  M Terbutalin 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gewaschen und permeabilisiert. Die intrazellulären Spiegel von phosphoryliertem CREB (pCREB) wurden mittels FACS bestimmt. Die Ergebnisse sind als prozentuale Veränderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (rote gestrichelte Linie) dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Tests nach Bonferroni verwendet.

Absoluter Mittelwert von pCREB nach Stimulation an Tag 0:  $0,84 \pm 0,25$ ; Tag 55:  $2,24 \pm 0,36$

n=3 pro Zeitpunkt. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$



### Abbildung 36 pERK MFI nach Stimulation

B-Zellen wurden aus Milzen von DBA Mäusen an den gezeigten Zeitpunkten im Verlauf der CIA mit MACS isoliert (p.i. = post Immunisierung, Tag 0: gesunde Tiere). Die Zellen wurden über Nacht in PBS+0,5%FCS bei 4°C gelagert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden entweder mit oder ohne  $10^{-6}$  M Terbutalin 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gewaschen und permeabilisiert. Die intrazellulären Spiegel von phosphoryliertem ERK1(2) (pERK) wurden mittels FACS bestimmt. Die Ergebnisse sind als prozentuale Veränderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (rote gestrichelte Linie) dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den S.E.M. Zur Berechnung der p-Werte wurden ANOVA und post-hoc-Tests nach Bonferroni verwendet.  $n=3$  pro Zeitpunkt.

Absoluter Mittelwert von pERK nach Stimulation an Tag 0:  
1,16±0,25; Tag 55: 2,36±0,26  
\*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

### 3.6 Partielle Korrelationen

Bei der statistischen Analyse der ermittelten Daten sollte untersucht werden, ob die Veränderung der untersuchten Signalwege statistisch auf die Dauer der Erkrankung, bzw. mit dem Alter der Tiere zu erklären sind oder auf die Schwere der Entzündung zurückzuführen sind.

Da es jedoch zum Teil Überschneidungen zwischen der Entzündungsschwere und der Erkrankungsdauer gibt, war es notwendig jeweils einen Einflussfaktor statistisch auszuschalten.

Dazu wurden partielle Korrelationen berechnet. Die partielle Korrelation ist der Zusammenhang zwischen zwei Größen, der übrigbleibt, nachdem für den Einfluss einer anderen Größe kontrolliert wurde.

Zusammenhang zwischen Dauer der Entzündung und Veränderungen im Signalweg des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors unter Kontrolle für den Entzündungsgrad (Arthritis Score)

**Tabelle 4 Partielle Korrelationen unter Kontrolle für den Entzündungsgrad**

Antigen	p38	CREB	ERK	GRK2	$\beta$ 2AR	pp38	pCREB	pERK	$\beta$ Arrestin2	$\alpha$ 1AR	IL10
Korrelation	-0,04	-0,11	-0,13	-0,37	-0,10	-0,17	-0,07	-0,08	-0,09	-0,07	0,25
p-Wert	0,785	0,471	0,383	0,016	0,492	0,242	0,664	0,589	0,531	0,675	0,121

Zusammenhang zwischen Schwere der Entzündung und Veränderungen im Signalweg des  $\beta$ <sub>2</sub>-Rezeptors unter Kontrolle für die Entzündungsdauer

**Tabelle 5 Partielle Korrelationen unter Kontrolle für die Entzündungsdauer**

Antigen	p38	CREB	ERK	GRK2	$\beta$ 2AR	pp38	pCREB	pERK	$\beta$ Arrestin2	$\alpha$ 1AR	IL10
Korrelation	0,5	0,21	0,44	0,32	0,25	0,38	0,43	0,48	0,42	0,54	-0,244
p-Wert	0,0004	0,161	0,002	0,034	0,085	0,009	0,003	0,001	0,004	0,0002	0,141

Es zeigt sich, dass nicht die Entzündungsdauer, sondern der Grad der Entzündung eng mit den Veränderungen im  $\beta$ <sub>2</sub>-Rezeptor Signalweg verknüpft ist. Auf die Bedeutung dieses Ergebnisses wird weiter unten eingegangen.

## 4. Diskussion

Die rheumatoide Arthritis ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, deren Ätiologie und Pathogenese noch immer nicht exakt verstanden ist.

Neben genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen spielen verschiedene Zelltypen eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. Die Regulation dieser Zellen durch verschiedene körpereigene Systeme, wie dem endokrinen System, dem Immunsystem selbst, aber auch dem autonomen Nervensystem spielt in der Forschung eine immer größere Rolle.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die B-Zellen im Mausmodell der RA.

Dabei wurde untersucht, ob und inwiefern sich die Signalwege des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors im Verlauf der Erkrankung verändern.

Zur besseren Übersicht für die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse stellt die Tabelle die Ergebnisse schematisch dar. Die Einteilung in frühe Arthritis (Tag 1-30), späte Arthritis (Tag 35-65) bzw. Übergangsphase (Tag 31-34) wurde analog zu Pongratz et al. *Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic*



*inflammation in arthritis* [148] vorgenommen. Die schematischen Pfeile zeigen dabei eine signifikante Veränderung gegenüber den gesunden Kontrollen (Tag 0) an.

**Tabelle 6 Schematischer Überblick über die Ergebnisse**

Untersuchtes Antigen	Frühe Arthritis	Übergangsphase	Späte Arthritis
$\beta_2$ -AR + Zellen	↑	↔	↑
$\beta_2$ -AR MFI	↔	↔	↔
$\alpha_1$ -AR + Zellen	↔	↔	↔
$\alpha_1$ -AR MFI	↔	↔	↑
GRK2	↓	↓	↓
$\beta$ Arrestin 2	↔	↔	↑
CREB	↑	↔	↑
pCREB	↔	↔	↑
ERK 1/2	↔	↔	↑
pERK 1/2	↔	↓	↔
p38	↔	↔	↔
pp38	↓	↔	↔
IL10 MFI	↔	↔	↑

Untersuchtes Antigen	Frühe Arthritis	Übergangsphase	Späte Arthritis
IL10 + Zellen	↑	↔	↑
pp38 nach Stimulation	↑	↑	↑
pERK nach Stimulation	↔	↔	↑
pCREB nach Stimulation	↔	↔	↑

#### 4.1 Expression der Adrenorezeptoren im Verlauf der Arthritis

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass B-Zellen funktionelle  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren exprimieren [33,34,38,61,62,63].

Dies konnte durch die oben dargestellten Ergebnisse bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Anteil der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor tragenden B-Zellen sich im Verlauf der Erkrankung verändert (Abbildung 14). Dabei zeigt sich, dass die  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiven B-

Zellen im Verlauf der Erkrankung in zwei Phasen ansteigen.

Unmittelbar nach Erkrankungsbeginn verändert sich der Anteil nicht. Gegen Ende der frühen Phase der Arthritis [148] steigt der Anteil dann signifikant an. In der Zwischenphase sinkt der Anteil wieder ab, um in der späten Phase [148] wieder anzusteigen. Während der gesamten Erkrankung bleibt die Rezeptordichte auf den untersuchten Milz B-Zellen konstant (Abbildung 15).

Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiven B-Zellen im Verlauf könnte eine selektive Proliferation dieser Zellen sein. Hinsichtlich des Einflusses von *cAMP*, dem *second-messenger* eines  $\beta_2$ -Stimulus, auf die Proliferation gibt es verschiedene Szenarien [34]. Diese sind abhängig von der jeweiligen Co-Stimulation durch Zytokine oder andere Mediatoren [34]. Eine gesteigerte Proliferation wurde dabei im Zusammenspiel aus *cAMP* und IL-1/anti-Ig sowie *cAMP* und IL-4/anti-Ig [34,163,164] gezeigt. Insbesondere IL-1 spielt in der gesamten Pathogenese der RA eine wichtige Rolle [10,24,164]. Eine gesteigerte

Proliferation  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiver B-Zellen in der Milz durch die gemeinsame Wirkung von *cAMP* und IL-1 stellt eine plausible Erklärung für das vermehrte Auftreten  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiven B-Zellen im Verlauf der CIA dar.

Inwiefern eine Einwanderung  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiver B-Zellen in die Milz zu der Beobachtung beiträgt, dass der Anteil  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiver B-Zellen im Verlauf ansteigt, ist nicht klar. Eine Zusammenstellung einer organspezifischen Verteilung  $\beta_2$ -Adrenorezeptor positiver B-Zellen gibt es in der Literatur nicht, sodass eine abschließende Bewertung einer Einwanderung bisher nicht möglich ist.

Ebenfalls untersucht wurde die Expression des  $\alpha_1$ -Adrenorezeptors auf den isolierten B-Zellen (Abbildungen 16, 17). Die Anwesenheit von  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren auf Zellen des Immunsystem ist schon länger bekannt [48]. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von  $\alpha_1$ -Rezeptoren im Laufe des Lebens einer Immunzelle verändert. Auf Zellen aus primären lymphatischen Organen konnten alle drei Subtypen des

$\alpha_1$ -Rezeptors nachgewiesen werden, auf PBMC's waren keine  $\alpha_1$ -Rezeptoren nachweisbar, während auf Zellen in den sekundären lymphatischen Organen vor allem  $\alpha_{1a}$  und  $\alpha_{1b}$ -Rezeptoren nachweisbar waren [48].

Inwiefern diese Beobachtungen auch auf B-Zellen zutreffen ist nicht klar. Insgesamt wird die Expression von  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren auf B-Zellen aber kontrovers diskutiert [47].

Die oben gezeigten Daten zeigen deutlich, dass es eine Population  $\alpha_1$ -Rezeptor positiver B-Zellen in der Milz gibt. Der Anteil der Zellen verändert sich im Verlauf der Entzündung nicht und unterscheidet sich nicht von den gesunden Kontrollen (Abbildung 16). Allerdings konnte mit der angewendeten Methode nicht zwischen den verschiedenen Subtypen des  $\alpha_1$ -Rezeptors unterschieden werden.

Während sich der Anteil  $\alpha_1$ -Rezeptor positiver B-Zellen nicht verändert, zeigt die Rezeptordichte im Verlauf der Erkrankung eine interessante Veränderung (Abbildung 17). Die Rezeptordichte korreliert hochsignifikant mit der

Schwere der Entzündung (Tabelle Partielle Korrelation). Dieses Ergebnis ist möglicherweise mit Beobachtungen in Monozyten erklärbar. Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  in der Lage sind, die Expression von  $\alpha_{1a}$ -Rezeptoren zu steigern [48,150]. Diese Zytokine spielen in der RA eine große proinflammatorische Rolle. Dies legt den Schluss nahe, dass zu Zeitpunkten hoher entzündlicher Aktivität und damit erhöhten  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}$  Spiegeln, die Expression von  $\alpha_1$ -Rezeptoren induziert wird.

Außerdem konnte auf Kardiomyozyten und THP-1 Zellen gezeigt werden, dass durch einen  $\beta_2$ -Stimulus die Expression von  $\alpha_{1b}$  und  $\alpha_{1d}$  Rezeptoren gesteigert werden kann [48]. Über welche Mechanismen dies vermittelt wird ist noch nicht nachvollzogen. Möglicherweise ist der Anstieg der  $\alpha_1$ - Rezeptordichte auch durch die Veränderungen im Signalweg des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors zu erklären. Zum einen nehmen die Zellen, die ein  $\beta_2$ -Signal verarbeiten können zu, dadurch könnten mehr Zellen auf einen  $\beta_2$ -Stimulus hin  $\alpha_1$ -Rezeptoren exprimieren. Allerdings nimmt der Anteil der  $\alpha_1$ - Rezeptoren positiven

Zellen nicht zu, sodass eher der Rückgang der GRK2 und die dadurch effektivere Signalübertragung in die Zelle zusätzlich zu den oben dargestellten Zusammenhängen einen Erklärungsansatz für die erhöhte Rezeptordichte des  $\alpha_1$ -Rezeptors darstellt.

Diese These wird durch die in den Abbildungen 18 und 19 gezeigten Korrelationsanalysen untermauert. Hier zeigt sich zwischen dem Expressionslevel des  $\beta_2$ -AR und dem Anteil der  $\alpha_1$ -AR positiven B-Zellen (Abbildung 18), sowie zwischen Expressionslevel des  $\beta_2$ -AR und dem Expressionslevel des  $\alpha_1$ -AR jeweils ein starker positiver Zusammenhang. Dies bedeutet, je höher die Dichte von  $\beta_2$ -AR auf den B-Zellen ist, desto mehr B-Zellen tragen den  $\alpha_1$ -AR tragen und desto mehr  $\alpha_1$ -Rezeptoren trägt die jeweilige Zelle. Eine plausible Erklärung ist eine  $\beta_2$ -AR induzierte Bildung von  $\alpha_1$ -AR in den B-Zellen.

Eine weitere, allerdings hypothetische, Erklärungsmöglichkeit für die Ergebnisse der Korrelationsanalysen stellt eine wechselseitige Beziehung zwischen  $\alpha_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR dar.

In den partiellen Korrelationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Expressionsdichte des  $\alpha_1$ -AR mit der Schwere der Entzündung korreliert. Es ist daher ein Szenario denkbar, bei dem es in stark proinflammatorischen Phasen der Erkrankung, durch Zytokine induziert [48,150] zur Expression von  $\alpha_1$ -AR kommt. Die  $\alpha_1$ -AR könnten zu einer Induktion von  $\beta_2$ -AR führen, die wiederum durch die Bildung von immunsupprimierendem IL-10 eine Art negativen Feedbackmechanismus zu der postulierten aktiven Entzündungsreaktion darstellen könnten. Es muss an dieser Stelle aber betont werden, dass diese Überlegungen rein hypothetischer Natur sind und es in der bestehenden Literatur keinen Hinweis auf die postulierten Mechanismen gibt. Dieser Hypothese steht auch das über den Verlauf der Arthritis konstant bleibende Expressionslevel des  $\beta_2$ -AR (Abbildung 15) sowie die geringe Korrelation des  $\beta_2$ -AR mit der Schwere der Entzündung (partielle Korrelationen) entgegen. Außerdem zeigt sich in den Abbildungen 20 und 21 keine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil  $\beta_2$ -AR



positiver B-Zellen und dem Anteil  $\alpha_1$ -AR positiver B-Zellen sowie dem Expressionslevel des  $\alpha_1$ -AR. Dies spricht ebenso gegen die Hypothese einer  $\alpha_1$ -AR induzierten Bildung von  $\beta_2$ -AR.

Insgesamt zeigen die Korrelationsanalysen zwischen dem  $\beta_2$ -AR und dem  $\alpha_1$ -AR einen Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel des  $\beta_2$ -AR und  $\alpha_1$ -AR. Zusammen mit dem Rückgang der GRK2 (Abbildung 22) scheint sich dies am ehesten durch eine  $\beta_2$ -AR induzierte Bildung von  $\alpha_1$ -AR erklären zu lassen.

Zur Beantwortung der Frage, warum IL-10 in B-Zellen besonders dann induziert wird, wenn diese zu späteren Phasen der Erkrankung entnommen werden, tragen die Ergebnisse des  $\alpha_1$ -AR bei, denn Noradrenalin als Haupttransmitter des SNS bindet nicht nur an  $\beta$ -AR, sondern auch mit hoher Affinität an  $\alpha$ -AR, die besonders in der späteren Phase durch die oben gezeigte erhöhte Expressionsdichte eine Bedeutung erlangen dürften.

Eine gesteigerte IL-10 Produktion konnte jedoch auch durch den selektiven  $\beta_2$ - Agonisten Terbutalin gezeigt werden [60].

Letztlich sind weitere Untersuchungen zur Funktion von  $\alpha_1$ - Rezeptoren auf B-Zellen, deren Rolle bei der Regulation von IL-10, der Regulation der Rezeptoren selbst und dem Zusammenhang zwischen  $\alpha_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR notwendig.

## 4.2 Veränderungen in der Rezeptorregulation

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die GRK2 in PBMC's von RA Patienten herunter reguliert wird [71,166] und dies zu Veränderungen im *downstream-signaling* des  $\beta_2$ -AR führt [71,166]. Dabei führte ein  $\beta_2$ -Stimulus zu deutlich erhöhten intrazellulären cAMP Spiegeln im Vergleich zu gesunden Kontrollen [71,166]. Dies konnte auch in einem Tiermodel der RA, der adjuvant induzierten Arthritis (AA) gezeigt werden [71]. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung; es konnte gezeigt werden, dass die GRK2 im Verlauf der CIA in B-Zellen herunter reguliert wird (Abbildung 22). Dabei fällt auf, dass der Rückgang bereits nach 3 Tagen, bereits vor Auftreten klinisch

fassbarer Symptome nachweisbar ist. Ein Erklärungsansatz für dieses Ergebnis ist die Tatsache, dass die Expression der GRK2 von Zytokinen reguliert wird [48,71]. Eine besondere Rolle konnte dabei für IL-6 gezeigt werden [71,166], das bei der RA eine wichtige Rolle spielt [10,24,165,166]. Dies erklärt einerseits den Rückgang der GRK2 im Generellen, andererseits aber auch den Rückgang vor der klinischen Manifestation. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression der GRK2 bereits vor Beginn der klinischen Symptomatik zurückgeht.

Der Rückgang der GRK2 stellt möglicherweise eine Kompensation der gesunkenen Katecholaminspiegel in den lymphatischen Organen [148,151,152] dar. Durch den Rückgang der GRK2 wird ein Stimulus effektiver in die Zelle übertragen [37,42,71,162,166], sodass die gesunkenen Katecholaminspiegel durch eine effektivere Signalübertragung kompensiert werden könnten.

Die Auswirkung der veränderten Rezeptorregulation auf die intrazelluläre Signalübertragung konnte in den

durchgeführten Experimenten beobachtet werden und wird später diskutiert.

Neben der GRK2 wurde auch die Expression von  $\beta$ -Arrestin 2 (Abbildung 23) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in der frühen Phase der Arthritis  $\beta$ -Arrestin 2 nicht verändert wird und in der späten Phase ab Tag 35  $\beta$ -Arrestin 2 signifikant ansteigt. Eine schlüssige Erklärung, warum  $\beta$ -Arrestin 2 in der Spätphase der Erkrankung ansteigt, ist in der bestehenden Literatur nicht ersichtlich. Spekulativ könnte die Ursache auf Ebene von Zytokinen gesucht werden.

Die Relevanz dieses Ergebnisses zeigt sich in den Stimulationsversuchen (siehe unten). Hier zeigte sich ein Anstieg von pERK nach  $\beta_2$ -Stimulation in der Spätphase der Arthritis. In der Literatur wird der „nicht kanonische“ [162] Signalweg des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors über  $\beta$ -Arrestin 2 hin zu ERK1/2 beschrieben [37,40,41,42,43,44,45,46,162]. Möglicherweise ist der Anstieg von pERK nach  $\beta_2$ -Stimulus in der Spätphase durch den Anstieg von  $\beta$ -Arrestin 2 begründet. Ob diese

Vermutung zutrifft, muss durch weitere Experimente untersucht werden, ebenso die Auswirkung eines aktivierten ERK1/2 Systems auf die B-Zellen. In der Literatur wird diesem System besonders bei chronischer Inflammation und hohem Sympathikotonus eine Bedeutung beigemessen [162]. Inwieweit dieses System bei der RA eine Rolle spielt und wie es im Verlauf der Entzündung reguliert wird muss in weiteren Studien erforscht werden.

#### 4.3 Intrazelluläre Second-Messenger

In den nicht stimulierten B-Zellen wurden die phosphorylierten p38 MAP Kinase, ERK 1/2 und CREB gemessen. Ein  $\beta_2$ -Stimulus ist in der Lage alle diese Signalwege zu stimulieren, allerdings sind auch andere Rezeptoren in der Lage diese Signalwege zu stimulieren. Alle drei *second-messenger* zeigen einen biphasischen Verlauf (Abbildungen 25, 27, 29). Die unterschiedlichen Level der spontan phosphorylierten *second-messenger* könnten also auf unterschiedliche Level stimulierender

Katecholamine zurückzuführen sein. Der Spiegel der ausgeschütteten Katecholamine hängt von zwei Faktoren ab: der „Feuerrate“ der Nervenendigungen und der Anzahl der Nervenendigungen.

Die Dichte sympathischer Nervenendigungen variiert im Verlauf der Arthritis [148,151] und auch der Noradrenalingehalt in der Milz von erkrankten Tieren nimmt ab [152]. Diese Beobachtung könnte den Rückgang der aktivierten *second-messenger* in der frühen Phase der Arthritis miterklären. Der Anteil an den *second-messengern*, der durch Transmitter des SNS hervorgerufen wird, kann anhand dieser Daten aber nicht bestimmt werden, da viele andere Signalwege ebenfalls diese *second-messenger* nutzen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in der späten Phase der Arthritis in der Synovia entzündeter Gelenke Zellen erscheinen, die Katecholamine produzieren [148,153]. Dies stellt möglicherweise eine Art Kompensationsmechanismus für den Rückgang der sympathischen Nervenendigungen dar. Auch in den lymphatischen Organen [154] wurde dieses Phänomen

beobachtet. Dabei wurde besonders in der späten Phase der Arthritis, in der die Dichte sympathischer Nervenendigungen am geringsten ist, eine hohe Anzahl Tyrosin-Hydroxylase positiver Zellen beobachtet [154].

Der Anstieg der phosphorylierten *second-messenger* in der späten Phase der Arthritis könnte seinerseits wiederum auf erhöhte lokale Katecholaminspiegel in der Spätphase der Arthritis hindeuten.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den Verlauf der *second-messenger* kann im Rückgang der GRK2 gesucht werden. Dass eine Reduktion der GRK2 zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber einem  $\beta_2$ -Stimulus führt, konnte bereits gezeigt werden [71,166]. Dieser Rückgang und die damit verbundene geringere Desensitisierung könnte den Anstieg der *second-messenger* erklären.

Allerdings nimmt die Expression der GRK2 bereits vor dem Anstieg der *second-messenger* deutlich ab und bleibt zwischen Tag 18 und Tag 70 nahezu konstant, sodass es eher unwahrscheinlich ist, dass der Rückgang der GRK2 den gezeigten biphasischen Verlauf der *second-messenger* verursacht.

Vielmehr scheint eine Veränderung stimulierender Transmitter als Erklärung plausibel zu sein. Möglicherweise ist die Quelle dieser Transmitter die skizzierte, katecholaminproduzierende Zellgruppe. Eine Unterscheidung, ob die *second-messenger* durch Katecholamine der TH+-Zellen hervorgerufen werden, oder durch andere Transmitter, ist anhand der erhobenen Daten nicht möglich.

#### 4.4 Intrazelluläres Interleukin 10

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Anteil der IL-10 positiven B-Zellen als auch der intrazelluläre IL-10 Spiegel in den B-Zellen im Verlauf der Arthritis variieren (Abbildungen 30, 31). Besonders deutlich zeigt sich ein Anstieg in der späten Phase der Arthritis. Ein ähnlicher Anstieg in der späten Arthritis zeigt sich auch bei den *second-messengern* (Abbildungen 25,27,29).

Es ist bekannt, dass die Expression von IL-10 von der PKA abhängt [132] und sowohl die p38 MAP Kinase als auch pCREB in diesen Prozess involviert sind



[18,68,69,70,124,126,128, 129]. Möglicherweise ist der Anstieg des IL-10 in der späten Arthritis durch den Anstieg der *second-messenger* begründet.

Auch die in Abbildung 33 gezeigte Korrelation zwischen dem  $\beta_2$ -Rezeptor, der die erwähnten Signalwege stimuliert, und IL-10 untermauert diese Vermutung. Hier zeigt sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil  $\beta_2$ -AR positiver Zellen und dem Anteil IL-10 positiver Zellen. Eine mögliche Interpretation für dieses Ergebnis stellt diese Hypothese dar:  $\beta_2$ -AR positive B-Zellen bilden bevorzugt IL-10.

Bei Abbildung 32 ergibt sich insgesamt zwischen dem  $\beta_2$ -AR MFI und dem IL-10 MFI ein negativer mathematischer Zusammenhang. Die Abbildung weist jedoch auf zwei unterschiedliche Populationen hin, zum einen eine Gruppe, die  $\beta_2$ -AR niedrig exprimiert und qualitativ einen starken positiven Zusammenhang mit IL-10 hat und zum anderen eine Gruppe, die  $\beta_2$ -AR weniger stark exprimiert und einen weniger starken, jedoch positiven Zusammenhang mit IL-10 zeigt. Eine exakte Zuordnung einer Gruppe in eine einzelne Phase der

Arthritis ist jedoch nicht möglich, vielmehr scheint es an den verschiedenen beobachteten Zeitpunkten jeweils unterschiedliche Populationen der B-Zellen hinsichtlich des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors zu geben.

Die oben geschilderte Assoziation zwischen IL-10 und den intrazellulären *second-messengern* (signifikanter Anstieg in der Spätphase der Arthritis) könnte auch Beobachtung aus anderen Experimenten erklären. Es wurde gezeigt, dass das Ausschalten des SNS in der späten Phase der Arthritis zu einer Verschlechterung der Arthritis führt [58]. In diesem Versuch wurde das SNS chemisch ausgeschaltet. In einem weiteren Versuch wurde gezeigt, dass mit dieser Methode auch die oben beschriebenen TH+ Zellen eliminiert werden [154]. Wie oben diskutiert, sind möglicherweise die TH+ Zellen für den Anstieg der *second-messenger* verantwortlich. Dieser Anstieg wiederum könnte den Anstieg des IL-10 verursachen. Werden nun die TH+ Zellen ausgeschaltet, sinkt die hemmende Wirkung von IL-10 und die Arthritis verschlechtert sich. Umgekehrt formuliert stellt der Anstieg des IL-10 in der späten Phase der Arthritis einen

Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung des SNS in dieser Phase der Arthritis dar.

Es muss aber betont werden, dass zur Bestätigung dieser Ergebnisse und Interpretationen weitere Experimente mit einer größeren Stichprobe notwendig sind. Zur Identifikation von unterschiedlichen Subpopulationen, die sich in der Korrelationsanalyse zwischen IL-10 und  $\beta_2$ -AR andeuten sind ebenfalls weitere Untersuchungen, zum Beispiel durch FACS Doppelfärbungen notwendig. Die Analyse der IL-10 Daten ist schwierig, nicht zuletzt, da die IL-10 positive B-Zellpopulationen am Rand der methodisch bedingten Nachweisgrenze liegt. Außerdem muss an dieser Stelle auf die geringe Stichprobengröße ( $n=3$ ) hingewiesen werden, die statistische Fehler wahrscheinlicher macht.

#### 4.5 Second-Messenger nach Stimulation

Die Ergebnisse des Stimulationsversuchs (Abbildungen 34,35,36) zeigen, dass sich der Signalpfad des  $\beta_2$ -

Rezeptors nicht nur morphologisch verändert, sondern auch funktionell.

Es konnte gezeigt werden, dass sich das Ansprechen der Signalwege im Verlauf der Erkrankung verändert (Abbildungen 34,35,36).

Der p38 Signalweg zeigt im Verlauf der Erkrankung ein stärkeres Ansprechen auf den  $\beta_2$ -Stimulus. Diese Beobachtung könnte dazu beitragen die proinflammatorische Wirkung des SNS in der frühen Phase der Arthritis zu erklären.

Die beiden anderen *second-messenger*, pCREB und pERK, zeigen in der frühen Phase der Arthritis kein signifikantes Ansprechen auf den  $\beta_2$ -Stimulus, erst in der Spätphase zeigt sich ein signifikantes Ansprechen auf den  $\beta_2$ -Stimulus (Abbildungen 35,36). Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist jedoch zu beachten, dass die gezeigten Ergebnisse nur relative Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen sind. Ein schwaches Ansprechen auf den Stimulus im Versuch könnte daher einerseits auf eine Verschiebung der Signalfade hindeuten, andererseits aber könnte dies

auch darauf hinweisen, dass ein Signalweg bereits sehr stark aktiviert ist und durch einen externen Stimulus nicht mehr signifikant gesteigert werden kann.

Der pERK Signalweg ist mit  $\beta$ -Arrestin 2 assoziiert [40,41,42,43,44,45]. Interessanterweise zeigt  $\beta$ -Arrestin 2 in der späten Phase der Erkrankung einen Anstieg (Abbildung 23). Es ist möglich, dass der Anstieg von  $\beta$ -Arrestin 2 den Anstieg von pERK nach  $\beta_2$ -Stimulation in der späten Erkrankungsphase ermöglicht.

pCREB nach  $\beta_2$ -Stimulation zeigt sich in der ersten Erkrankungsphase nur wenig erhöht; in der späten Phase jedoch einen signifikanten Anstieg nach  $\beta_2$ -Stimulus.

Diese Beobachtung kann einerseits auf eine Veränderung in der Signalübertragung, die zu einer gesteigerten Bildung von pCREB führt, hinweisen. Andererseits könnte sie darauf hindeuten, dass dieser Signalweg zu anderen Zeitpunkten bereits aktiviert war und ein externer Stimulus keine weitere Steigerung hervorrufen konnte und nun in der späten Phase der Signalweg

wiederum weniger stark aktiviert ist und ein Stimulus eine Steigerung bewirken kann.

Die oben diskutierte Veränderung des Signalwegs scheint weniger durch das Absinken der GRK2 und einer damit verbundenen effektiveren Signalübertragung eines Stimulus [71] in die Zelle erklärbar zu sein, da die GRK2 bereits kurz nach Induktion der Arthritis deutlich vermindert (Abbildung 22) ist. Weshalb genau pCREB durch einen  $\beta_2$ -Stimulus erst in der Spätphase der Erkrankung gesteigert wird, kann mit den erhobenen Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Zusammen mit den Ergebnissen von pp38 nach Stimulation ist das pCREB Ergebnis aber eine plausible Erklärung für die Beobachtung, dass IL-10 durch einen  $\beta_2$ -Stimulus nur gesteigert werden kann, wenn die Zellen aus einem arthritischen Tier entnommen wurden [132].

Die Abhängigkeit der IL-10 Expression von den der PKA nachgeschalteten Signalwegen pCREB und p38 MAP Kinase ist beschrieben [18,68,69,70,124,126,128,129,132].

IL-10 kann besonders in der Spätphase der Arthritis durch einen  $\beta_2$ -Stimulus gesteigert werden [60]. Daher erscheint besonders die Veränderung des pCREB Signalweges notwendig, um IL-10 nach  $\beta_2$ -Stimulus steigern zu können. In der späten Phase, wenn pCREB nach  $\beta_2$ -Stimulation ansteigt, könnten die Voraussetzungen für eine Steigerung von IL-10 gegeben sein. Außerdem steigt der Anteil  $\beta_2$ -AR positiver B-Zellen an, sodass in der Spätphase mehr Zellen da sind, die den Stimulus aufnehmen und umsetzen können.

Zusammen mit den Beobachtungen in der Rezeptorregulation (Abbildungen 22, 23) den Ergebnissen des Stimulationsversuchs (Abbildungen 34,35,36) und dem Verlauf  $\beta_2$ -AR positiver B-Zellen ergeben sich für die unterschiedliche Wirkung des SNS in den unterschiedlichen Phasen der Arthritis weitere Erklärungsaspekte.

Durch den Anstieg der  $\beta_2$ -AR positiven B-Zellen und der Steigerung von pp38 nach einem  $\beta_2$ -Stimulus kann in der Frühphase der Arthritis ein adrenerger Stimulus mehr B-

Zellen erreichen und die p38 MAP Kinase aktivieren. Dieser Zusammenhang könnte die proinflammatorische Wirkung des SNS in der Frühphase der Arthritis miterklären.

Der gleiche Ansatz könnte auch eine Erklärung für die antiinflammatorische Wirkung des SNS in der späteren Phase der Arthritis sein. Mehr Zellen sind in der Lage das  $\beta_2$ -Signal zu empfangen und effektiv in die Zelle zu übertragen. Im Vergleich zur Frühphase wird nun auf einen  $\beta_2$ -Stimulus hin signifikant mehr pCREB in den Zellen gebildet. Zusammen mit der Erhöhung von pp38 könnte dies zu einer vermehrten Bildung von IL-10 führen, dessen antiinflammatorische Eigenschaften bekannt sind [128].

Um diese Hypothese zu belegen, sind aber noch weitere Experimente notwendig, die insbesondere untersuchen, inwiefern pCREB und pp38 gemeinsam notwendig sind, um IL-10 zu steigern.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die zu Beginn des Projekts gestellte Hypothese einer Veränderung des  $\beta_2$ -



Rezeptorsignalwegs in der CIA, die eine Steigerung der IL-10 Produktion durch einen  $\beta_2$ -Stimulus ermöglicht.

## 5. Ausblick

Für eine abschließende Bestätigung der Hypothese sind weitere Experimente notwendig, die die hier beschriebenen Korrelationen kausal nachweisen. Ein möglicher Versuchsaufbau dazu könnte sein, zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Arthritis B-Zellen aus den Mäusen zu entnehmen und sich mit FACS Mehrfachfärbungen alle hier beobachteten Antigene auf bzw. in jeweils einer Zelle zu messen. Außerdem könnten die Zellen von verschiedenen Zeitpunkten der Arthritis mit einem  $\beta_2$ -Agonisten stimuliert werden und untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt die Steigerung der IL-10 Produktion stattfindet. Dabei könnte auch mit Kombinationen aus verschiedenen Inhibitoren des Rezeptorsystems und der intrazellulären Signalwege die Abhängigkeit der IL-10 Steigerung vom jeweiligen Signalweg überprüft werden. Diese Ergebnisse könnten

dann mit den FACS Mehrfachfärbungen in Zusammenhang gebracht werden.

Außerdem sollten die hier gezeigten Ergebnisse mit weiteren Methoden bestätigt werden. Interessant wäre eine Analyse der Veränderungen der Rezeptoren und von IL-10 auf genetischer Ebene. Außerdem ist es wichtig die gezeigten Ergebnisse an menschlichen Zellen zu bestätigen und Möglichkeiten zu finden den Zusammenhang zwischen  $\beta_2$ -Stimulus und IL-10 Steigerung als pharmakologisches Target zu nutzen. Ein Ansatzpunkt könnte hier der kürzlich zur Behandlung der Psoriasisarthritis zugelassene PDE4 Inhibitor Apremilast sein. Dieser Wirkstoff hemmt den Abbau von intrazellulärem cAMP, erhöht dadurch die Produktion von IL-10 [159] und vermindert die Bildung von TNF $\alpha$  [159].

Auch für die Veränderung von pCREB nach einem  $\beta_2$ -Stimulus im Verlauf der Arthritis gibt es derzeit noch keine komplett schlüssige Erklärung. Auch in diesem Aspekt besteht durch weitere Forschung Klärungsbedarf.

Insbesondere hier wäre es interessant eine therapeutische Möglichkeit zur Steigerung von pCREB zu entwickeln. Letztendlich weisen die gezeigten Ergebnisse auf eine enge Verknüpfung einerseits von Entzündung und  $\alpha_1$ -Rezeptoren sowie andererseits von  $\alpha_1$ -Rezeptoren und  $\beta_2$ -Rezeptoren auf B-Zellen hin. Die  $\alpha_1$ -Rezeptoren wurden auf B-Zellen bisher noch nicht eingehend erforscht. Weiterführende Experimente könnten sich mit den genauen Rezeptorsubtypen und den Auswirkungen einer  $\alpha_1$ -Stimulation auf die B-Zellen beschäftigen.

## 6. Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis ist eine Erkrankung, die sich nicht nur auf Gelenke und gelenknahe Strukturen beschränkt, sondern alle Systeme des Körpers betrifft. In den letzten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen endokrinem System, dem Nervensystem und dem Immunsystem entdeckt und stellt bis heute ein Gebiet intensiver Forschung dar.

Es konnte gezeigt werden, dass das sympathische Nervensystem einen Einfluss auf die rheumatoide Arthritis hat und sich die Wirkung des SNS je nach Erkrankungsphase unterscheidet. Außerdem wurde nachgewiesen, dass ein  $\beta_2$ -Stimulus in der Lage ist die Interleukin 10 Produktion von B-Zellen zu steigern, allerdings nur, wenn diese Zellen aus erkrankten Mäusen entnommen wurden. Dies führte zur Hypothese, dass im Verlauf der CIA eine Veränderung des  $\beta_2$ -Rezeptorsignalpfads erfolgt, die eine Steigerung der Interleukin 10 Produktion ermöglicht.

Um diese Annahme zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, mit der der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor, seine Regulation und die nachgeschalteten intrazellulären Signalpfade im Verlauf der Erkrankung beobachtet wurden. Dabei wurde in Mäusen experimentell eine Arthritis hervorgerufen. Zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf wurden die Mäuse getötet, und aus der Milz B-Zellen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mittels FACS auf Veränderungen im Signalweg des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors

untersucht. In einem weiteren Versuchsteil wurden die Zellen einem definierten  $\beta_2$ -Stimulus ausgesetzt und die aktivierten *second-messenger* mittels FACS bestimmt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass im Verlauf der CIA der Anteil der  $\beta_2$ -AR tragenden B-Zellen ansteigt, während die Dichte der Rezeptoren gleichbleibt. Mit der beschriebenen Methode konnte der in der Literatur widersprüchlich diskutierte  $\alpha_1$ -Rezeptoren auf den B-Zellen nachgewiesen werden. Die Zahl der B-Zellen, die den  $\alpha_1$ -Rezeptor trägt, verändert sich im Verlauf der Arthritis nicht und zeigt keinen Unterschied zu den gesunden Kontrollen. Allerdings verändert sich die Rezeptordichte und zeigt eine starke Korrelation zur Schwere der Entzündung.

Es wurde auch gezeigt, dass sich im Verlauf der Arthritis Veränderungen in der Regulation des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors ergeben. Die GRK2 wird bereits kurz nach Induktion der Arthritis deutlich herunter reguliert. Außerdem wurde gezeigt, dass auch  $\beta$ -Arrestin 2 sich im Verlauf der Erkrankung verändert. Während  $\beta$ -Arrestin 2 in der

frühen Phase der Erkrankung unverändert bleibt, zeigt sich ein Anstieg ab Tag 35.

Bei den beobachteten *second-messengern*, die in den nicht stimulierten Zellen erhoben wurden, zeigte sich stets ein biphasischer Verlauf. In der frühen Krankheitsphase zeigte sich ein milder Abfall, in der späten Phase ein Anstieg. Dieser Verlauf könnte zum Teil die lokalen Katecholaminspiegel widerspiegeln, die durch den Verlust sympathischer Nervenfasern und aufkommende TH+ Zellen beeinflusst werden.

Bei der Analyse des intrazellulären IL-10 zeigte sich ein Anstieg im Verlauf der Erkrankung. Dies steht möglicherweise mit den ansteigenden Katecholaminspiegeln und dem Anstieg der *second-messenger* pp38 und pCREB in der späten Phase der Erkrankung in Zusammenhang und untermauert die antiinflammatorische Wirkung des SNS in der Spätphase der Arthritis.

In einem weiteren Versuchsteil wurden die isolierten B-Zellen über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag für 30 Minuten mit  $10^{-6}$ M Terbutalin bei

37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die phosphorylierten second-messenger mittels FACS bestimmt.

Hier zeigte sich, dass pp38 durch einen  $\beta_2$ -Stimulus während der gesamten Erkrankung gesteigert werden kann. pCREB und pERK hingegen sind in der frühen Phase der Erkrankung im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen nicht verändert, in der späten Erkrankungsphase zeigt sich jedoch ein Anstieg im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollen. Das veränderte Ansprechen auf den  $\beta_2$ -Stimulus ist möglicherweise auf die Veränderung der GRK2 und  $\beta$ -Arrestin 2 zurückzuführen.

Die Veränderung in den Signalwegen, insbesondere von pCREB ist möglicherweise der Grund, dass die IL-10 Produktion durch einen  $\beta_2$ -Stimulus nur in Zellen aus erkrankten Tieren möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Verlauf der CIA zu einer Veränderung des  $\beta_2$ -Rezeptorsignalpfads kommt. Diese Veränderung ist auf mehreren Ebenen des Signalpfads nachweisbar und eine

mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass für die IL-10 Steigerung durch einen  $\beta_2$ -Adrenorezeptorstimulus Entzündung notwendig ist.

Die gezeigten Zusammenhänge könnten in Zukunft von klinischer Relevanz sein, da das IL-10 System in der Arthritis ein potentes therapeutisches Ziel darstellt.



## 7. Literatur

[1] Herbert Renz-Polster, Steffen Krautzig. **Basislehrbuch Innere Medizin**, 4. Auflage. München, Urban und Fischer Verlag 2008, Seite 1064-1121

[2] Gerd Herold und Mitarbeiter. **Innere Medizin 2015**. Köln 2015, Gerd Herold (Hrsg.)

[3] Sandberg ME, Bengtsson C. **Recent infections are associated with decreased risk of rheumatoid**

**arthritis: a population-based case-control study.** Ann Rheum Dis. 2015 Feb 5.

[4] Papadopoulos NG, Alamanos Y, Voulgari PV, Epagelis EK, Tsifetaki N, Drosos AA. **Does cigarette smoking influence disease expression, activity and severity in early rheumatoid arthritis patients?** Clin Exp Rheumatol. 2005 Nov-Dec;23(6):861-6.

[5] Alamanos Y, Drosos AA. **Epidemiology of adult rheumatoid arthritis.** Autoimmun Rev. 2005 Mar;4(3):130-6.

[6] Murphy K., Travers P., Walport M. **Janeway Immunologie**, 7. Auflage. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag 2009, Seite 755- 1055

[7] Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. **A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-**

**DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheumatology. 2004 (50) Seite: 3085-3092.

[8] Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumagai S. **Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies.** Annals of Rheumatic Disease. 2010 (69) Seite: 70-81.

[9] Pratesi F., Migliorini P. **Something old, something new: Biomarkers in rheumatoid arthritis.** The Journal of Rheumatology. 2014 Seite: 2091-2093

[10] McInnes I.B., Schett G. **The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.** The New England Journal of Medicine. 2011 Seite: 2205-2219

[11] MacGregor A.J., Snieder H., Rigby A.S. et al. **Characterizing the quantitative genetic contribution**

**to rheumatoid arthritis using data from twins.**

Arthritis Rheumatology 2000 (43) Seite: 30-7

[12] Capellino S., Cosentino M., Wolff C., Schmidt M., Grifka J., Straub RH. **Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target.** Annual of Rheumatic Disease 2010 (69) Seite:1853–1860

[13] Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, et al. **Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase.** Arthritis Rheumatology 2008 (58) Seite: 3009–3019.

[14] Scher JU, Ubeda C, Pillinger MH, et al. **Characteristic oral and intestinal microbiota in rheumatoid arthritis (RA): a trigger for autoimmunity?** Arthritis Rheumatology 2010 (62) Suppl:1390

[15] Lam T, Thomas LM, White CA, Li G, Pone EJ, Xu Z, Casali P. **Scaffold functions of 14-3-3 adaptors in B cell immunoglobulin class switch DNA recombination.** PLoS One. 2013;8e80414.

[16] Maksymowych W., Naides S., Marotta A. et al. **Serum 14-3-3h is a Novel Marker that Complements Current Serological Measurements to Enhance Detection of Patients with Rheumatoid Arthritis.** Journal of Rheumatology 2014 (41) Seite: 2104-2113

[17] Maksymowych WP, Marotta A. **14-3-3 $\eta$ : a novel mediator up-regulated by TNF $\alpha$ , reflects clinical response to anti-TNF $\alpha$  therapy [abstract].** Arthritis Rheumatology 2011 (63) Suppl 10: Seite 162–163.

[18] Pongratz G., Straub Rh. **The B cell, arthritis, and the sympathetic nervous system.** Brain, Behavior, and Immunity, 2010 (24) Seite: 186-192

[19] Ito K, Chung KF, Adcock IM. **Update on glucocorticoid action and resistance.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2006 (3) Seite: 522-543.

[20] Karow T, Lang-Roth R. **Allgemeine und Spezielle Pharmakologie 2013.** 21 Auflage. Köln, Thomas Karow (Hrsg.)

[21] Straub, R. H., Paimela, L., Peltomaa, R., Schölmerich, J., Leirisalo-Repo, M. **Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to IL-6 and TNF in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis.** Arthritis Rheumatology. 2002 (46) Seite: 654–662

[22] Straub RH, Gunzler C, Miller LE, Cutolo M, Scholmerich J, Schill S. **Antiinflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro.** FASEB J 2002 (9) Seite:993–1000.

[23] Bradley JR. **TNF-mediated inflammatory disease.**

Journal of Pathology. 2008 (2) Seite: 149-160.

[24] Brennan FM, McInnes IB. **Evidence that cytokines**

**play a role in rheumatoid arthritis.** Journal of Clinical

Investigation 2008 (118) Seite: 3537-3545.

[25] Trepel M. **Neuroanatomie, Struktur und**

**Funktion.** 5. Auflage, 2012. München, Urban&Fischer

Verlag.

[26] McCorry L. **Physiology of the Autonomic Nervous**

**System.** American Journal of Pharmaceutical Education

2007 (4) Article 78.

[27] Gekle M., et al. **Taschenlehrbuch Physiologie.**

Stuttgart 2010, Thieme Verlag.

[28] Deutzmann R. **Mechanismen der**

**Signaltransduktion.** In: Rassow R, Hauser K,

Deutzmann R (Hrsg.). **Duale Reihe, Biochemie** 2. Auflage. Stuttgart 2008, Thieme Verlag.

[29] Straub RH (Hrsg.). **Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen**. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007

[30] Pongratz G, Sanders VM. Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone auf und in Immunzellen. In: Straub RH (Hrsg.). **Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen**. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 47–55.

[31] Härle P. Signaltransduktion der Noradrenalin-vermittelten Geninduktion. In:



Straub RH (Hrsg.). **Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen.** Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 60–64.

[32] Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA, Livnat S. **Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue.** Journal of Immunology. 1985 (135) Seite: 755-765.

[33] Williams L., Snyderman R., Lefkowitz RJ. **Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-) (3H) alprenolol binding.** Clinical Investigation. 1976 (57) Seite 149–155.

[34] Kohm AP, Sanders VM. **Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+T and B lymphocyte function in vitro and in vivo.** Pharmacol. Reviews. 2001(53) Seite: 487–525.

[35] Elenkov I, Wilder R, Chrousos G, Vizi E. **The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system.** Pharmacol. Rev. 2000 (52) Seite: 595–638.

[36] Rosenbaum D, Rasmussen S., Kobilka B. **The structure and function of G-protein-coupled receptors.** Nature. 2009 (7245) Seite: 356–363

[37] Benovic J. **Novel  $\beta_2$ -adrenergic receptor signaling pathways.** Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002 (110) Seite: 229-235.

[38] Pongratz G, McAlees J, Conrad D, Sanders, V. **The Level of IgE Produced by a B Cell Is Regulated by Norepinephrine in a p38 MAPK- and CD23-Dependent Manner.** Journal of Immunology 2006; (177) Seite: 2926-2938

[39] Ming Zheng, Sheng-Jun Zhang, Wei-Zhong Zhu, Bruce Ziman, Brian K. Kobilka, Rui-Ping Xiao.  **$\beta_2$ -**

**Adrenergic Receptor-induced p38 MAPK Activation Is Mediated by Protein Kinase A Rather than by G<sub>i</sub> or G<sub>βγ</sub> in Adult Mouse Cardiomyocytes.** The Journal of Biological Chemistry, 2000 Vol. 275, No. 51 Seite: 40635–40640

[40] Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ. **β-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β<sub>2</sub> adrenergic receptor.** Journal of Biological Chemistry. 2006 (2) Seite:1261-1273

[41] Luttrell L., Lefkowitz RJ. **The role of β-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals.** Journal of Cell Science 2002 (115) Seite: 455-465

[42] Evron T, Daigle TL, Caron MG. **GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor**

**desensitization.** Trends in Pharmacological Science.

2012 (3) Seite: 154-164.

[43] Reiter E., Lefkowitz RJ. **GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling.**

2006. TRENDS in Endocrinology and Metabolism  
Vol.17 No.4

[44] Lefkowitz RJ, Shenoy S. **Transduction of Receptor Signals by  $\beta$ -Arrestins.** 2005 Science (308) Seite: 512-517

[45] Shenoy S, Lefkowitz RJ. **Multifaceted roles of  $\beta$ -arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling.** 2003  
Journal of Biochemistry (375) Seite: 503–515

[46] Perry, S.J. et al. **Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins.** 2002 Science (298) Seite: 834–836

[47] Nance DM, Sanders VM. **Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007)**. 2007 Brain Behaviour and Immunity (21) Seite: 736–45.

[48] Kavelaars A. **Regulated expression of  $\alpha$ -1 adrenergic receptors in the immune system**. 2002 Brain Behaviour and Immunity (16) Seite: 799–807

[50] Schauenstein K, Liebmann P. Regulation von Immunfunktionen durch Katecholamine. In: Straub RH (Hrsg.). **Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen**. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, S. 91–102

[51] Müller-Ladner U, Gay S. Rheumatoide Arthritis: Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis. In: Straub RH (Hrsg.). **Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie**. Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 2007, Seite: 70–98

[52] Haas HS, Schauenstein K. **Immunity, hormones, and the brain.** 2001 Allergy (6) Seite: 470–77

[53] Mignini F, Streccioni V, Amenta F. **Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation.** 2003 Auton Autacoid Pharmacol (1) Seite: 1–25.

[54] Sanders VM, Straub RH. **Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity.** 2002 Brain Behav. Immun (4) Seite: 290–332

[55] Dekkers JC, Geenen R, Godaert GL, Bijlsma JW, van Doornen. **Elevated sympathetic nervous system activity in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis with active disease.** 2004 Clin Exp Rheumatol. (22) Seite: 63-70

[56] Pongratz G, Straub RH. **B-cell involvement in the pathogenesis of RA-is there**

**a contribution of the sympathetic nervous system?**

2008 Immunol. Res (2) Seite:148–63.

[57] Kuis W, de Jong-de Vos van Steenwijk C, Sinnema G, Kavelaars A, Prakken B, Helders PJ, Heijnen CJ. **The autonomic nervous system and the immune system in juvenile rheumatoid arthritis.** 1996 Brain Behav Immun. (4) Seite: 387-98.

[58] Härle P, Möbius D, Carr DJJ, Schölmerich J, Straub RH. **An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis.** 2005 Arthritis Rheum (4) Seite: 1305–1313

[59] Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. **The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release**

**from synovial macrophages.** 2000 FASEB J (13) Seite: 2097–107.

[60] Pongratz G, Melzer M, Straub RH. **The sympathetic nervous system stimulates anti-inflammatory B cells in collagen-type II-induced arthritis.** 2012 Annals of the rheumatic diseases (71) Seite: 432-439

[61] Pochet R, Delespesse G, Gausset PW, Collet H. **Distribution of beta-adrenergic receptors on human lymphocyte subpopulations.** Clin. Exp. Immunol 1979 (3) Seite 578–84.

[62] Podojil JR, Kin NW, Sanders VM. **CD86 and beta2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3'-IgH enhancer in B cells.** J. Biol. Chem 2004;(22) Seite: 23394–23404.



[63] Kohm AP, Sanders VM. **Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo.** J. Immunol 1999; (9) Seite: 5299–308.

[64] Kin, N. and Sanders, V.M. **It takes nerve to tell T and B cells what to do.** 2006 J. Leuk. Biol., (79) Seite: 1093-1104

[65] Kasprowicz DJ, Kohm AP, Berton MT, Chruscinski AJ, Sharpe A, Sanders VM. **Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell.** 2000 J. Immunol (2) Seite: 680–90.

[66] van der Stoep N, Quinten E, van den Elsen PJ. **Transcriptional regulation of the MHC class II trans-activator (CIITA) promoter III: identification of a novel regulatory region in the 5'-untranslated region and an important role for cAMP-responsive element**

**binding protein 1 and activating transcription factor-1 in CIITA-promoter III transcriptional activation in B lymphocytes.** 2002 J. Immunol (9) Seite: 5061–5071.

[67] Zhu XS, Linhoff MW, Li G, Chin KC, Maity SN, Ting JP. **Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter.** 2000 Mol.Cell. Biol (16) Seite: 6051–6061.

[68] Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S. **Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells.** 1999 Eur. J. Immunol. (29) Seite: 3098-3104

[69] Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD. **Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis**

**factor-alpha and cAMP elevating drugs.** 1995 Int Immunol. (4) Seite: 517-523

[70] Brenner S, Prösch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzter C. **cAMP-induced Interleukin-10 Promotor Activation Depends on CCAAT/Enhancer-binding Protein expression and monocytic Differentiation.** 2003 The Journal of Biological Chemistry (8) Seite 5597-5604

[71] Lombardi MS, Kavelaars A, Cobelens PM, Schmidt RE, Schedlowski M, Heijnen CJ. **Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system.** 2001 Journal of Immunology (166) Seite: 1635-1640.

[72] Edwards JC, Cambridge G. **Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes.** 2001 Rheumatology (Oxford) (40) Seite: 205–211.

[73] Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. **Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis.** 2004 New England Journal of Medicine (350) Seite: 2572–2581.

[74] Burkhardt H, Koller T, Engstrom A, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsch HG, et al. **Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse.** 2002 Arthritis Rheum (46) Seite: 2339–2348.

[75] Newkirk MM. **Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity?** 2002 Clin. Immunol (104) Seite: 1–13.

[76] Clerck LS de, Westedt ML, Cats A, Vermeer BJ, Weltevreden EF, Bridts CH, et al. **IgE deposition in normal skin of patients with rheumatoid arthritis in**

**relation to clinical and laboratory findings.** 1985 Ann. Rheum. Dis (44) Seite: 772–777.

[77] Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. **Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis.** 2002 Science (297) Seite: 1689–1692.

[78] Eisenberg R. **Do autoantigens define autoimmunity or vice versa?** 2005 Eur. J. Immunol (35) Seite: 367–370.

[79] Antonescu C, Mayerat C, Mantegani A, Tissot JD. **Hepatitis C Virus (HCV) Infection: Serum Rheumatoid Factor Activity and HCV Genotype Correlate With Cryoglobulin Clonality.** 1998 blood (92) Seite: 3486-3488

[80] Nandakumar K S, Bäcklund J, Vestberg M, Holmdahl R. **Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the**

**arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells.** 2004 Arthritis Res Ther. (6) Seite: 544-550.

[81] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. **Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells.** 2000 Nat. Immunol (1) Seite: 475–482.

[82] O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, et al. **Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10.** 1990 Int. Immunol (2) Seite: 821–832.

[83] Pistoia V. **Production of cytokines by human B cells in health and disease.** Immunol. Today 1997(18) Seite: 343–350.

[84] Sartori, A. et al. **Interleukin-12: an immunoregulatory cytokine produced by B cells and**

**antigen-presenting cells.** 1997 Methods (11) Seite: 116–127.

[85] Okamura, H., Kashiwamura, S. -I., Tsutsui, H., Yoshimoto, T. & Nakanishi, K. **Regulation of interferon- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18.** 1998 Curr. Opin. Immunol. (10) Seite: 259–264.

[86] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. **Role of cytokines in rheumatoid arthritis.** 1996 Ann Rev Immunol (14) Seite: 397–440

[87] Williams RO, Feldmann M, Maini RN. **Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis.** 1992 Proc Natl Acad Sci USA (89) Seite: 9784–9788.

[88] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al. **Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis.** 1991 EMBO J (10) Seite: 4025–4031.

[89] Vassalli P. **The pathophysiology of tumor necrosis factors.** 1992 Ann Rev Immunol (10) Seite: 411–452

[90] Wang JM, Walter S, Mantovani A. **Re-evaluation of the chemotactic activity of tumor necrosis factor for monocytes.** 1990 Immunology (71) Seite: 364–367.

[91] Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. **Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group.** 2000 N Engl J Med (343) Seite: 1594–1602.

[92] Hirano T, Matsuda T, Turner M, et al. **Excessive production of interleukin 6/B-cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis.** 1988 Eur J Immunol (18) Seite: 1797–1801



[93] Houssiau FA, Devogelaer JP, Van DJ, de Deuxchaisnes CN, Van SJ. **Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** 1988 Arthritis Rheum (31) Seite: 784–788

[94] Takai Y, Seki N, Senoh H, et al. **Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen-induced arthritis.** 1989 Arthritis Rheum (32) Seite: 594–600

[95] Hermann E, Fleischer B, Mayet WJ, Poralla T, Zum Meyer Buschenfelde KH. **Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis.** 1989 Clin. Exp. Rheumatol (7) Seite: 411–414.

[96] Sawada T, Hirohata S, Inoue T, Ito K. **Correlation between rheumatoid factor and IL-6 activity in**

**synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis.** 1991 Clin Exp Rheumatol (9) Seite: 363–368

[97] Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, et al. **Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis.** 1998 J Exp Med (187) Seite: 461–468.

[98] Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, et al. **Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice.** 1999 Arthritis Rheum (42) Seite: 1635–1643.

[99] Mihara M, Nishimoto N, Ohsugi Y. **The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody.** 2005 Expert Opin Biol Ther (5) Seite: 683–690

[100] Roll P, Muhammad K, Schumann M, Kleinert S, Einsele H, Dorner T, et al. **In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B**

**cell compartment.** 2011 Arthritis Rheum (63) Seite: 1255–1264.

[101] Hirano T. **Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease.** 1992 Clin Immunol Immunopathol (62) Seite: 60–65

[102] Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. **Biology of interleukin-10.** 2010 Cytokine & Growth Factor Reviews (21) Seite: 331–344

[103] Burdin N, Rousset F, Banchereau J. **B-cell-derived IL-10: production and function.** 1997 Methods (11) Seite 98–111.

[104] Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, DangW, Mosmann TR, et al. **Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome linked immunodeficiency B cells.** 1990 J Exp Med (172) Seite: 1625–1631.

[105] Levy Y, Brouet JC. **Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein.** 1994 J Clin Invest (93) Seite: 424–428.

[106] Rousset F, Peyrol S, Garcia E, Vezzio N, Andujar M, Grimaud JA, et al. **Longterm cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4.** 1995 Int Immunol (7) Seite: 1243–1253

[107] Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, et al. **Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis.** 1995 Arthritis Rheum (38) Seite :96–104

[108] Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. **Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis.** 1994 J Exp Med (179) Seite 1517–1527

[109] Persson S, Mikulowska A, Narula S, O'Garra A, Holmdahl R. **Interleukin-10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats.** 1996 Scand J Immunol (44) Seite: 607–614

[110] Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, et al. **Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis.** 1996 Arthritis Rheum (39) Seite: 495–503

[111] Tanaka Y, Otsuka T, Hotokebuchi T, et al. **Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice.** 1996 Inflamm Res (45) Seite: 283–288

[112] Apparailly F, Verwaerde C, Jacquet C, Auriault C, Sany J, Jorgensen C. **Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis.** 1998 J Immunol (160) Seite: 5213–5220

[113] Henningsson L, Eneljung T, Jirholt P, Tengvall S, Lidberg U, et al. **Disease-Dependent Local IL-10 Production Ameliorates Collagen Induced Arthritis in Mice**. 2012 PLoS ONE 7(11): e49731

[114] Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. **Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B-cells**. 2003 J Exp Med (197) Seite: 489–501.

[115] Rodriguez-Pinto D. **B-cells as antigen presenting cells**. 2005 Cell Immunol (238) Seite: 67–75

[116] Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan CM, Gammon G. **Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire**. 1993 Immunol Today (14) Seite: 203–208

[117] Watts C, Lanzavecchia A. **Suppressive effect of antibody on processing of T-cell epitopes**. 1993 J Exp Med (178) Seite: 1459–1463

[118] Davidson HW, Watts C. **Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes.** 1989 J Cell Biol (109) Seite: 85–92

[119] Liang B, Mamula MJ. **Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens.** 2000 Cell Mol Life Sci (57) Seite: 561–568

[120] Hollander GA, Castigli E, Kulbacki R, et al. **Induction of alloantigen-specific tolerance by B-cells from CD40-deficient mice.** 1996 Proc Natl Acad Sci USA (93) Seite: 4994–4998

[121] Buhlmann JE, Foy TM, Aruffo A, et al. **In the absence of a CD40 signal, B-cells are tolerogenic.** 1995 Immunity (2) Seite: 645–653

[122] **Nandakumar KS, Bäcklund J, Vestberg M, Holmdahl R.** Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the

arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells.

2004 *Arthritis Res Ther* (6) Seite 544-550

[123] Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. **B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10.** 2002 *Nat Immunol* (3) Seite: 944–950.

[124] Chung EY, Liu J, Homma Y, Zhang Y, Brendolan A, Saggese M, et al. **Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1.** 2007 *Immunity* (27) Seite: 952–964.

[125] Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O’Garra A. **Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose.** 2009 *Immunity* (31) Seite: 209–219.



[126] Ma W, Lim W, Gee K, Aucoin S, Kumar A. **The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages.** 2001 J Biol Chem. (276) Seite: 13664-13674

[127] Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. **Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes.** 1992 J Immunol (148) Seite: 3618–3623.

[128] Moser D, Zhang X. **Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine.** 2008 Immunological Reviews (226) Seite: 205-218

[129] Brightbill HD, Plevy S, Modlin R, Smale S. **A Prominent Role for Sp1 During LPS-Mediated Induction of the IL-10 Promotor in Macrophages.** 2000 J Immunol (164) Seite: 1940-1951

[130] Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. **Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression.** 2000 J Immunol (165) Seite: 1612–1617

[131] Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. **Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology.** 2008 Nat Rev Immunol (8) Seite: 391–397.

[132] Pongratz G, Melzer M, Straub RH. **The sympathetic nervous system stimulates anti-inflammatory B cells in collagen-type II-induced arthritis.** 2012 Ann Rheum Dis (71) Seite: 432-439

[133] Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, et al. **The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells.** 1995 Blood (85) Seite: 3577–3585.

[134] Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. **Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation – a continuing puzzle.** 2004 Immunology (113) Seite: 281–292

[135] Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. **Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding.** 1999 J Biol Chem (274) Seite: 31868–31874.

[136] Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. **The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes.** 1999 J Interferon Cytokine Res (19) Seite: 563–573.

[137] Staples KJ, et al. **IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3.** 2007 J Immunol (178) Seite: 4779–4785

[138] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. **Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** 1991 J Exp Med (174) Seite: 1209–1220.

[139] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** 1991 J Immunol (147) Seite: 3815–382.

[140] de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. **Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.** 1991 J Exp Med (174) Seite: 915–924.

[141] Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. **Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.** 1998 J Immunol (160) Seite: 3188–3193.

[142] Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. **Interleukin-10 induces a longterm antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells.** 1996 J Exp Med (184) Seite: 19–29.

[143] Deng X, Crowson CS, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Larson DR, Therneau TM, Matteson EL, Kyle RA, Katzmann JA, Gabriel SE, Davis JM. **Elevation of serum immunoglobulin free light chains during the preclinical period of rheumatoid arthritis.** 2015 J Rheumatol. (42) Seite: 181-187

[144] de Vries N, Tijssen H, van Riel PL, van de Putte LB. **Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the**

**HLA-DRB1 molecule.** 2002 Arthritis Rheum. 46 Seite: 921.

[145] du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, Pierlot C, Quillet P, Bardin T, Prum B, Cornelis F, Clerget-Darpoux F. **New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility.** 2005 Arthritis Rheum. (52) Seite:1063.

[146] Michou L, Croiseau P, Petit-Teixeira E et al. **Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis.** 2006 Arthritis Res Ther. 8: R79

[147] Woolley DE. **The mast cell in inflammatory arthritis.** 2003 N Engl J Med. 348 Seite: 1709.

[148] Pongratz G, Straub RH. **Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis.** 2013 Nature Reviews Rheumatology Seite: 117-126

[149] Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR. **Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 → SEK1/MKK4 → p38 mitogen-activated protein kinase pathway.** 1998 J Biol Chem; (273) Seite:12901–12908

[150] Heijnen CJ, van der Voort CR, van de Pol M, Kavelaars A. **Cytokines regulate  $\alpha$ 1-adrenergic receptor mRNA expression in human monocytic cells and endothelial cells.** 2002 Journal of Neuroimmunology (125) Seite: 66 – 72

[151] Lorton D, Lubhan C, Lindquist C, Bellinger D. **Changes in the Density and Distribution of Sympathetic Nerves in Spleens from Lewis Rats with Adjuvant-Induced Arthritis Suggest That an Injury and Sprouting Response Occurs.** 2005 The Journal of Comparative Neurology (489) Seite: 260 –273

[152] Lorton D, Lubhan C, Bellinger D. **Norepinephrine content in primary and secondary lymphoid organs is altered in rats with adjuvant-induced arthritis.** 1997 Mechanisms of Ageing and Development (94) Seite: 145–163

[153] Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. **Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target.** 2010 Annual of Rheumatic Disease (69) Seite: 1853-1860

[154] Capellino S, Weber K, Gelder M, Härle P, Straub RH. **First Appearance and Location of Catecholaminergic Cells During Experimental Arthritis and Elimination by Chemical Sympathectomy.** 2012 Arthritis Rheumatism (64) Seite:1110-1118



[155] Kostenko S, Dumitriu G, Lægreid KJ, Moens U. **Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinaseactivated p38-regulated/activated protein kinase.** 2011 World Journal of W J B C Biological Chemistry (5) Seite: 73-89

[156] Pongratz G, Straub RH. **The sympathetic nervous response in inflammation.** 2014 Arthritis research & therapy (16) Seite: 504-515

[157] Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA: **Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones.**1986 Science (233) Seite: 652–654.

[158] Schramm LP. **Spinal sympathetic interneurons: their identification and roles after spinal cord injury.** 2006 Prog. Brain Research (152) Seite 27-37

[159] Palfreeman, A, McNamee K, McCann F. **New developments in the management of psoriasis and**

**psoriatic arthritis: a focus on apremilast.** 2013 Drug Design, Development and Therapy (7) Seite: 201–210.

[160] Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A.  
**Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss.** 2016 Ann Rheum Dis (75) Seite: 721-729

[161] Cronstein B. **Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis.** 2005 Pharmacol Rev (57) Seite:163–172

[162] Lorton D, Bellinger D. **Molecular Mechanisms Undelaying  $\beta$ -Adrenergic Receptor-Mediated Corss-Talk between Sympathetic Neurons and Immune Cells.** 2015 International Journal of Moleculas Sciences (16) Seite: 5635-5665

[163] Hoffmann MK. **The requirement for high intracellular cyclic adenosine monophosphate**

**concentrations distinguishes two pathways of B cell activation induced with lymphokines and antibody to immunoglobulin.** 1988 Journal of Immunology (140) Seite:580–582

[164] Vazquez A. **Modulation of IL-2- and IL-4-dependent human B cell proliferation by cyclic AMP.** 1991 Journal of Immunology (46) Seite: 4222-4227.

[165] Choy E. **Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** 2012 Rheumatology (51) v3-v11

[166] Lombardi MS, Kavelaars A, et al. **Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis.** 1999 FASEB (13) Seite: 715-725



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Georg Pongratz für die freundliche Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung.

Danken möchte ich dem gesamten Laborteam, insbesondere Frau Madlen Melzer für die geduldige Unterstützung und Hilfe im Labor.

Der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg für die finanzielle Unterstützung durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Meinen Eltern für die Unterstützung auf meinem Weg und während des Studiums.

Außerdem gilt mein Dank meiner Freundin Hannah Weiß für die moralische Unterstützung in anstrengenden Zeiten

sowie meinem Freund Oliver Schmidt für lebhafte und hilfreiche Diskussionen.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name:	Clemens Julian Wiest
Adresse:	Dahlienweg 43 93053 Regensburg
E-Mail:	clemens.wiest@web.de
Geburtsdatum:	30.06.1991
Geburtsort:	Schwäbisch Gmünd

### **Schulausbildung**

1997-2009	Grundschule (Karl Stirner-Schule, Rosenberg) Gymnasium (Peutinger Gymnasium, Ellwangen)
-----------	---

### **Hochschulausbildung**

12/2010 - 06/2017	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
05/2017	Approbation als Arzt
09/2017	Beginn der Facharztausbildung für Innere Medizin Caritas Krankenhaus St. Josef Regensburg

Regensburg, Oktober 2017